



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

*Estudo de polimorfismos no gene que codifica a
proteína kelch K13, um marcador de resistência às
artemisininas, em Moçambique e Angola*

Autor: Carlos Gil Escobar

Orientador: Prof. Doutor Luís Varandas

Coorientadora: Investigadora Fátima Nogueira

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical, especialidade de Medicina Tropical

ARTIGOS SUBMETIDOS

Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* K13-propeller in Angola and Mozambique after the introduction of the ACTs. Carlos Escobar, Sara Pateira, Elsa Lobo, Lis Lobo, Rosa Teodosio, Fernanda Dias, Natércia Fernandes, Ana Paula Arez, Luis Varandas, Fatima Nogueira. Submetido à revista *PLOS one* a 16 de dezembro de 2014 (Manuscript number: PONE-D-14-56363).

AGRADECIMENTOS

À Isália, o meu pilar, pela paciência e amor

Aos meus pais, eles merecem

À Sara e a Soraia, pela ajuda inestimável

RESUMO

A malária por *Plasmodium falciparum* é ainda um grave problema de saúde mundial, principalmente na África subsaariana. O aparecimento de resistência aos diversos antimaláricos tem sucessivamente minado esta luta. O Sudeste asiático é historicamente o principal foco de aparecimento e dispersão para África destas resistências. As combinações com derivados das artemisininas são eficazes e recomendadas pela Organização Mundial da Saúde como tratamento de primeira linha desde 2006. No entanto, diversos estudos apontam para vários sinais do aparecimento de resistência a estes fármacos na região do Grande Mekong desde o início da década de 2000: maior taxa de falência terapêutica e de parasitemia ao terceiro dia de tratamento e uma velocidade de eliminação parasitária inferior. No início de 2014, Ariey *et al.* descreveram um marcador molecular que se correlaciona com este fenótipo de resistência, mutações no gene PF3D7_1343700 que codifica a proteína *kelch* K13, tendo a Organização Mundial da Saúde incluído este marcador na definição de resistência parcial às artemisininas em setembro de 2014. A monitorização da dispersão de parasitas resistentes torna-se assim uma ferramenta fundamental.

Pretendeu-se estudar a presença de polimorfismos no gene PF3D7_1343700, antes e depois da introdução desta classe terapêutica, em dois países africanos de língua portuguesa: Moçambique e Angola. Para este efeito, foram analisadas 200 isolados de ADN de *Plasmodium falciparum* que se encontravam conservadas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 100 de cada país em estudo, e dentro de cada país 50 para cada grupo temporal (2003-05 e 2010-12). Os estudos originais foram aprovados pelos respetivos comités de ética.

Foi otimizada uma reação em cadeia da polimerase para amplificação de um fragmento do gene em estudo que continha as mutações já descritas. Após confirmação de produto por eletroforese em gel de agarose, o produto foi purificado e enviado para sequenciação. A sequência obtida foi comparada com a estirpe de referência 3D7. A previsão de estrutura e da alteração funcional da proteína foi realizada mediante as ferramentas *on line* RaptorX e PROVEAN, respetivamente.

Foram observados três polimorfismos da proteína *kelch* K13 em cinco amostras do período após a introdução das artemisininas: V494I, R575R e R471R, sendo os dois primeiros descritos pela primeira vez neste trabalho. O polimorfismo V494I, encontrado em Moçambique, situa-se no codão seguinte a uma das mutações atualmente associadas a resistência às artemisininas (Y493H) e na mesma região estrutural, mas a previsão funcional foi neutral. As mutações R575R e R471R, presentes em Angola, são sinónimas. Esta última foi reportada em outros dois países africanos, a República Democrática do Congo e no Gabão. Não foram encontrados os polimorfismos associados a resistência parcial às artemisininas, o que está de acordo com outros estudos realizados em África, sendo o presente estudo o primeiro a descrever estes resultados em Moçambique e Angola. No entanto, deverá ser mantida a vigilância epidemiológica com este marcador e com marcadores das drogas associadas às artemisininas para predizer a emergência deste fenómeno em África.

PALAVRAS CHAVE: malária, resistência a fármacos, marcador molecular, *K-13 propeller*

ABSTRACT

Plasmodium falciparum malaria is still a major health problem worldwide, especially in sub-Saharan Africa. The emergence of resistance to several antimalarial drugs has successively undermined this fight. Southeast Asia is historically the main focus of occurrence and spread to Africa of these resistances. Artemisin-based combination therapies are effective and recommended by the World Health Organization as first-line treatment since 2006. However, several studies point to several signs of emergence of resistance to these drugs in the Greater Mekong region since the beginning of the 2000: higher rate of treatment failure and parasitemia at day 3 and a slower parasite clearance rate. Early in 2014, Arieu et al. described a molecular marker that correlates with this resistance phenotype, mutations in the gene PF3D7_1343700 encoding the kelch K13 protein, which the World Health Organization included in the definition of partial resistance to artemisinin in September 2014. The monitoring of the dispersion of resistant parasites thus becomes an essential tool.

The aim of this study is to search for polymorphisms in the gene PF3D7_1343700 before and after the introduction of this therapeutic class in two African Portuguese-speaking countries: Mozambique and Angola. For this purpose, 200 samples of *Plasmodium falciparum* DNA conserved in the Institute of Tropical Medicine and Hygiene were analyzed, 100 in each country and within each country 50 for each time group (2003-05 and 2010-12). The original studies were approved by the respective ethics committees.

A polymerase chain reaction was optimized to amplify a gene fragment containing the already described mutations. After confirming the product by electrophoresis on agarose gel, the product was purified and sent for sequencing. The sequence obtained was compared to the reference strain 3D7. The structure prediction and functional alteration of the protein was performed using the tools online RaptorX and PROVEAN, respectively.

This analysis revealed three polymorphisms in kelch K13 in five samples of the period after the introduction of artemisinin-based therapies: V494I, R575R and R471R, the first two being firstly described. The V494I polymorphism found in Mozambique, lies next to a mutation associated with resistance to artemisinin (Y493H) and in the same structural region, but the functional prediction was neutral. The R575R and R471R mutations present in Angola, are synonymous. The latter was reported in two other African countries, the Democratic Republic of Congo and Gabon. There were no polymorphisms associated with partial resistance to artemisinins, which is in line with other studies conducted in Africa, and this study is the first to describe these results in Mozambique and Angola. However, epidemiological surveillance should be maintained with this marker and markers associated with artemisinin partner drug to predict the emergence of this phenomenon in Africa.

KEY WORDS: malaria, drug resistance, molecular marker, K13-propeller

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. MALÁRIA	1
1.2. O PARASITA DA MALÁRIA	1
1.2.1. Classificação sistemática	1
1.2.2. Ciclo de vida de Plasmodium	2
1.3. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	4
1.4. CONTROLO DA MALÁRIA	5
1.4.1. Fármacos antimaláricos	5
1.4.2. Resistência a antimaláricos	8
1.4.2. Resistência aos derivados da artemisinina.....	10
1.5. MONITORIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ANTIMALÁRICOS	14
1.5.1. Ensaio in vivo.....	15
1.5.2. Ensaio in vitro	16
1.5.3. Marcadores moleculares de resistência.....	17
1.6. MALÁRIA EM MOÇAMBIQUE E ANGOLA.....	19
1.6.1. Moçambique	19
1.6.2. Angola	20
1.7. OBJETIVOS	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL BIOLÓGICO	22
2.2. PESQUISA DE POLIMORFISMOS NO GENE PF3D7_1343700.....	22
2.2.1. Otimização da reação de amplificação por PCR	23
2.2.2. Amplificação do fragmento do gene por PCR.....	23
2.2.3. Confirmação de produto por eletroforese em gel de agarose	24
2.2.4. Sequenciação do ADN.....	24
2.2.5. Estrutura e função	25
3. RESULTADOS	26
3.1. Características das amostras	26
3.2. Resultados da otimização da reação de amplificação	26

3.3. Presença de polimorfismos no gene PF3D7_1343700	28
3.4. Avaliação estrutural dos polimorfismos no gene PF3D7_1343700	29
3.5. Avaliação funcional dos polimorfismos no gene PF3D7_1343700	30
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	52

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*
- Figura 2. Classificação dos países de acordo com a fase de eliminação da malária, segundo a OMS
- Figura 3. Regimes de ACT em países endêmicos de Malária
- Figura 4. Fatores que influenciam a definição de resistência às artemisininas
- Figura 5. Mortalidade estimada por cada 100.000 habitantes por malária e localização geográfica de Moçambique e Angola
- Figura 6. Origem geográfica das amostras
- Figura 7. Produto de amplificação mediante o uso de combinações de *primers* e diluições
- Figura 8. Produto de amplificação de ADN da primeira e segunda reação de PCR
- Figura 9. Localização dos polimorfismos encontrados em Angola e Moçambique
- Figura 10. Estrutura do domínio propulsor *kelch* de K13
- Figura 11. Estrutura tridimensional do alinhamento da proteína *kelch* K13 *wild type* e do polimorfismo V494I mediante o *software* Raptor X
- Figura 12. Representação esquemática da função do complexo KEAP1-Nrf2

INDICE DE TABELAS

Tabela I. Principais fármacos antimaláricos

Tabela II. Primeira definição de trabalho de resistência às artemisininas

Tabela III. Definição em vigor de resistência parcial às artemisininas

Tabela IV. Resumo da situação de resistência aos derivados da artemisinina na região do
Grande Mekong

Tabela V. Marcadores moleculares conhecidos para fármacos antimaláricos

Tabela VI. Características dos *primers* utilizados no estudo

Tabela VII. Mistura de reagentes da primeira reação de PCR

Tabela VIII. Condições de amplificação da primeira reação de PCR

Tabela IX. Condições de amplificação da segunda reação de PCR

Tabela X. Distribuição das amostras por província, localidade e ano

Tabela XI. Resumo das reações de PCR realizadas por grupo de amostras

Tabela XII. Substituição de nucleótidos e aminoácidos dos polimorfismos encontrados

Tabela XIII. Previsão funcional das estruturas proteicas associadas aos polimorfismos
descritos

Tabela XIV. Polimorfismos do gene PF3D7_1343700 descritos na literatura e no presente
estudo

LISTA DE ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

ACT – *artemisin-based combination therapy* / combinação de derivados da artemisinina

ADN – ácido desoxirribonucleico

AL – artemeter + lumefantrina

AQ – amodiaquina

AS – artesunato

bp – *base pairs* / pares de bases

CQ – cloroquina

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

K13 – *Kelch propeller 13*

MQ – mefloquina

PCR – *polymerase chain reaction* / reação em cadeia da polimerase

RD – República Democrática

RSA – *ring-stage survival assay*

SNP – *single nucleotide polymorphism* / polimorfismo pontual

SP – sulfadoxina-pirimetamina

WHO / OMS – *World Health Organization* / Organização Mundial da Saúde

1. INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA

A malária é uma doença causada pelo parasita *Plasmodium*, transmitida ao ser humano pela picada do mosquito *Anopheles*. Das cinco espécies que podem infectar o ser humano, *Plasmodium falciparum* é responsável pela maioria dos casos graves.

Em 2012, a OMS estima que tenham ocorrido em todo o mundo, 207 milhões de casos de malária e 627.000 mortes, das quais 90% na África subsaariana e 77% em crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2013a)

A gravidade da doença é variável e compreende um espectro que vai das formas não complicadas às formas graves, como a malária cerebral. O diagnóstico precoce mediante microscopia ou testes rápidos é fundamental para que o tratamento seja iniciado atempadamente. A terapêutica tem o intuito de reduzir a gravidade das manifestações clínicas e as suas complicações e, ainda, a transmissibilidade da doença.

1.2. O PARASITA DA MALÁRIA

1.2.1. Classificação sistemática

O parasita da malária tem a seguinte classificação taxonómica:

Reino Protista

Filo Apicomplexa

Classe Hematozoa

Ordem Haemosporida

Família Plasmodiidae

Género *Plasmodium*

Existem cinco espécies que infectam e causam doença ao homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*.

1.2.2. Ciclo de vida de *Plasmodium*

A transmissão da malária inicia-se com a inoculação, durante uma refeição sanguínea de mosquito do género *Anopheles*, de esporozoítos móveis na corrente sanguínea do hospedeiro (humano) que em menos de uma hora atingem e invadem o fígado, dando início à esquizogonia hepática (Figura 1). Os esporozoítos diferenciam-se em esquizontes hepáticos por divisão mitótica nos hepatócitos, dando lugar a cerca de 10.000 a 30.000 merozoítos (formas assexuadas), em cerca de seis a oito dias. Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos não completam a diferenciação até esquizontes, permanecendo nos hepatócitos sob a forma de hipnozoítos.

A rotura do esquizonte hepático liberta os merozoítos dentro de um merosoma, que permite a chegada à corrente sanguínea. Uma vez libertados da membrana do merosoma, os merozoítos invadem os eritrócitos, iniciando a fase de esquizogonia eritrocítica. A invasão do eritrócito é realizada em três fases (adesão, reorientação e invasão) nas quais participam moléculas de adesão do parasita e de superfície do eritrócito, e o complexo apical composto por estruturas do citoesqueleto e vacúolos secretores (Cowman *et al.*, 2012).

O crescimento intra-eritrocitário do parasita provoca uma remodelação celular com alteração da membrana celular para facilitar a aderência e importação de nutrientes. O crescimento do parasita leva à sua diferenciação em trofozoíto eritrocitário. A divisão nuclear dentro do eritrócito origina o esquizonte eritrocitário, com cerca de oito até 32 novos merozoítos, os quais se libertam quando os eritrócitos rebentam, podendo os merozoítos invadir novos eritrócitos completando o ciclo. Desta forma, o parasita expande-se entre seis a 20 vezes por cada ciclo, que em *P. falciparum* ocorrem com intervalos de cerca de 48 horas. Após seis a oito dias da saída dos merozoítos dos hepatócitos a densidade parasitária chega ao ponto de deteção na circulação periférica mediante microscopia ou testes rápidos, e a fase sintomática da doença inicia-se. O período de incubação entre a inoculação e o desenvolvimento de sintomas é de cerca de 12 a 14 dias.

Os merozoítos eritrocitários não regressam ao fígado e não existem formas dormentes (hipnozoítos) na malária provocada por *P. falciparum*, pelo que a ocorrência de recaídas é inexistente, ao contrário de *P. vivax* ou *P. ovale*.

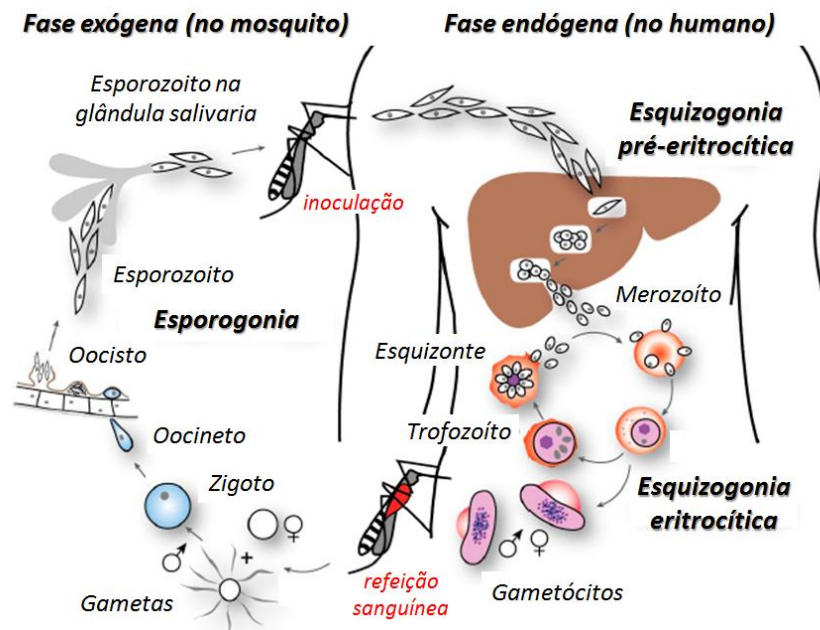


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* (adaptado de Cowman *et al.*, 2012)

Durante o ciclo eritrocitário, alguns merozoítos invadem a hemácia e diferenciam-se em formas sexuadas (gametócitos) que podem transmitir a malária ao mosquito quando de uma refeição sanguínea. A gametocitogênese em *P. falciparum*, atinge o seu pico aos 7-10 dias após o início da parasitemia assexuada.

O ciclo sexuado do parasita inicia-se no hospedeiro humano, mas precisa de ser continuado na sua fase de esporogonia no mosquito. Após a ingesta sanguínea pelo mosquito, os gametócitos libertam-se dos eritrócitos e iniciam a fertilização no lúmen do estômago do mosquito. Os gametócitos masculinos produzem até oito microgâmetas flagelados que se separam e se movimentam livremente até ao macrogâmeta (gâmeta feminino). A fertilização tem lugar no lúmen do estômago e dá lugar ao zigoto, onde ocorre a meiose. O zigoto transforma-se em oocineto, que invade o epitélio da mucosa do estômago e se aloja na lâmina basal e sofre meiose, originando o oocisto. A divisão mitótica leva a maturação do oocisto, que liberta centenas de esporozoítos que migram através da hemolinfa e invadem as glândulas salivares. Após cerca de duas semanas desde o início do ciclo, o mosquito torna-se transmissor da malária.

1.3.EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A malária é considerada pela OMS endêmica em 104 países do mundo (Figura 2). Em 97 países existe transmissão da malária, 12 dos quais em fase de pré-eliminação e sete na fase de eliminação. Por outro lado, sete países são classificados como estando em fase de prevenção de re-introdução (WHO, 2013a).

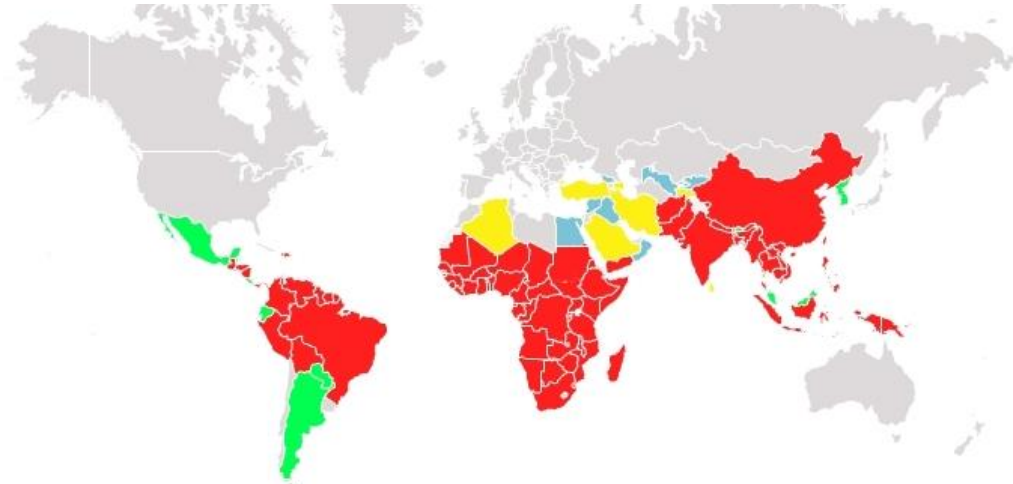


Figura 2. Classificação dos países de acordo com a fase de eliminação da malária, segundo a OMS. Vermelho: controlo, amarelo: eliminação, verde: pré-eliminação, azul: prevenção de re-introdução

Estima-se que cerca de 3.4 biliões de pessoas no mundo se encontra em risco de contrair malária, das quais cerca de 2.2 biliões em zonas de baixa transmissão (<1 caso por cada 1.000 habitantes). Das 1.2 biliões de pessoas em zonas de elevada transmissão (>1 caso por cada 1.000 habitantes), 47% correspondem a região africana e 37% ao sudeste Asiático.

Em 2012 terão ocorrido 207 milhões de casos de malária. A mortalidade foi estimada em cerca de 627.000 pessoas, das quais mais de 90% correspondem à África subsaariana e 77% a crianças com menos de cinco anos de idade. No entanto, quando comparado o período 2000-2012 tem-se assistido a um decréscimo da mortalidade em cerca de 42% a nível mundial.

A principal espécie causadora de doença e mortalidade é *P. falciparum*, cuja infecção pode ser grave em até 5% dos casos, principalmente em indivíduos com menor imunidade.

1.4. CONTROLO DA MALÁRIA

A malária é uma doença prevenível e tratável, desde que sejam asseguradas as intervenções necessárias para tal efeito. As recomendações a nível internacional (WHO, 2013a) centram o controlo da malária em:

- a) Estratégias de controlo do vetor, baseadas em: i) limitar o contato vetor-humano mediante o uso de redes mosquiteiras tratadas com inseticida ou pulverização de inseticida, o que facilita a prevenção a nível individual e comunitário; ii) diminuição da intensidade de transmissão, diminuindo/eliminando as populações de mosquitos locais mediante a gestão ambiental e controlo larvar;
- b) Quimioprevenção das populações mais suscetíveis, nomeadamente na grávida e na criança, mediante a utilização de regimes de tratamento intermitente preventivo;
- c) Confirmação do diagnóstico mediante a utilização de testes rápidos ou microscopia fiáveis e facilmente disponíveis no terreno, o que permite evitar a utilização de antimaláricos nos casos negativos, assegurar um melhor conhecimento nas falências terapêuticas e desenvolver uma rede de vigilância e monitorização fiável;
- d) Tratamento atempado e apropriado da doença com fármacos eficazes (adequados à espécie e ao padrão de resistência local), evitando a utilização de antimaláricos em monoterapia e medicamentos contrafeitos.

Os objetivos do *Global Malaria Action Plan* da OMS visam alcançar no ano 2015, uma redução da mortalidade por malária para 0%, uma redução no número de casos em 75% (em comparação com o ano 2000) e eliminar a malária em 10 novos países assim como na região europeia.

1.4.1. Fármacos antimaláricos

Os fármacos antimaláricos têm como objetivo principal a diminuição da morbilidade e mortalidade da malária através da eliminação do parasita. Em termos de saúde pública, pretende-se ainda diminuir a sua transmissibilidade, limitar os reservatórios humanos dos parasitas e prevenir o aparecimento e dispersão de resistência aos antimaláricos (WHO, 2010a).

O arsenal terapêutico contra a malária resume-se a nove famílias de fármacos esquematizadas na Tabela I (WHO, 2010a).

Tabela I. Principais fármacos antimaláricos (adaptado de WHO, *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance 2000-2010*; WHO, *Guidelines for the treatment of malaria*, 2010)

Família	Fármacos
4-aminoquinolinas	Cloroquina, amodiaquina, piperaquina
Aminoálcoois	Quinino, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina
Sulfonamidas e sulfonas	Sulfadoxina, sulfaleno, dapsona
Biguanidas	Proguanil, cloroproguanil
Diaminopirimidina	Pirimetamina
8-aminoquinolinas	Primaquina
Lactonas sesquiterpênicas	Artemisinina, arteeter, artemeter, artesunato, dihidroartemisinina
Antibióticos	Azitromicina, clindamicina, doxiciclina, tetraciclina
Naftoquinonas	Atovaquona

Para os turistas que viajam para zonas endêmicas de malária, o *Center for Disease Control* americano recomenda a utilização de cloroquina, mefloquina, atovaquona-proguanil, primaquina ou doxiciclina como quimioprofilaxia segundo o itinerário de viagem, os padrões locais de resistência e o estado de saúde do viajante (CDC, 2014).

Para tratamento preventivo intermitente na criança pequena e na grávida (a partir do primeiro trimestre), a OMS recomenda a utilização de sulfadoxina-pirimetamina em zonas de transmissão moderada e elevada (WHO, 2013a).

No que diz respeito ao tratamento dos acessos de malária, em 2001 a OMS recomendou a utilização dos ACT como fármacos de primeira linha naqueles países onde a malária por *P. falciparum* tinha desenvolvido elevados níveis de resistência aos antimaláricos utilizados até à data (cloroquina, mefloquina, pirimetamina-sulfadoxina, amodiaquina) (WHO, 2001). O número de países que tem assumido os ACT como fármacos de primeira linha tem

aumentado progressivamente desde que foram oficialmente recomendados pela OMS em 2006. Atualmente é a classe terapêutica mais comumente utilizada em todo o mundo (Figura 3), tendo sido adotados como tratamento de primeira linha em 79 dos 88 países onde *P. falciparum* é endêmico (WHO, 2013a).

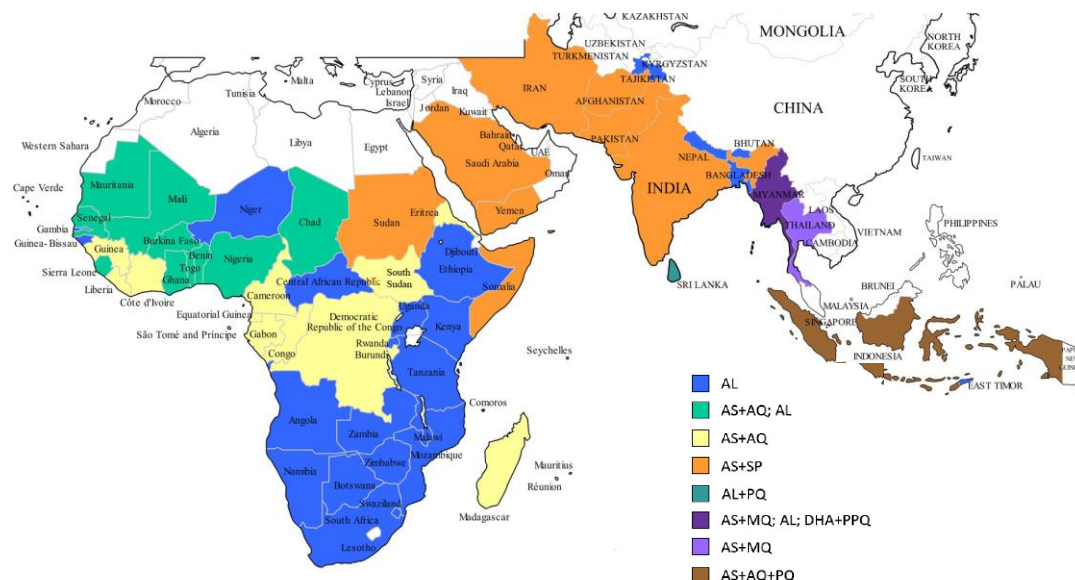


Figura 3. Regimes de ACT em países endêmicos de Malária (adaptada da *WorldWide Antimalarial Resistance Network*, disponível em www.wwarn.org)

Algumas características das combinações de derivados de artemisininas são:

- rapidez de ação sobre as formas assexuadas e elevada eficácia (redução em 100 a 1.000 vezes a carga parasitária num ciclo assexuado);
- rápida eliminação do derivado da artemisinina, pelo que o seu uso em esquemas curtos (três dias) deve ser realizado em conjunto com fármacos de semivida longa. O esquema curto permite aumentar a adesão ao regime e limita o número de tomas incompletas, no entanto, a eliminação definitiva de cerca de 10% da carga parasitária fica dependente do fármaco companheiro;
- combinação com outro antimalárico que seja eficaz, com mecanismo de ação diferente e de semivida mais longa. Permite a eliminação dos parasitas remanescentes, assim como dificulta o aparecimento de resistência ao ACT pela necessidade do *Plasmodium* desenvolver dois mecanismos de resistência simultâneos;
- boa tolerabilidade, que facilita a adesão;
- ação gametocida, que facilita uma diminuição da transmissibilidade da doença.

O primeiro ACT, artemeter + lumefatrina (AL) foi registado em 1992 sob a apresentação num único comprimido. Atualmente, cinco combinações encontram-se aprovadas para seu uso como tratamento da malária (WHO, 2013a): artesunato + mefloquina (ASMQ), artemeter + lumefantrina (AL; Coartem® e Riamet®), artesunato + amodiaquina (ASAQ; Coarsucam®), artesunato + sulfadoxina/pirimetamina (AS-SP) e dihidroartemisinina + piperaquina (DHA-PQ, Artekin® e Eurartesim®).

Apesar das recomendações da OMS para limitar a comercialização de formulações de derivados de artemisinina em monoterapia, nove países no mundo mantinham em 2013 esta comercialização, entre os quais Angola (WHO, 2013a).

1.4.2. Resistência a antimaláricos

A resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos é um fator de vital importância para conseguir o controlo e erradicação da malária. Ao longo dos anos, os diversos esforços levados a cabo para tentar um melhor controlo da doença tem sido afetados pelo aparecimento de resistência aos fármacos que foram desenvolvidos para este propósito.

Em 1967, a OMS definiu a resistência a fármacos como a capacidade do parasita de sobreviver ou se multiplicar apesar da administração e absorção de um fármaco dada na dose adequada ou superior à recomendada, mas dentro da tolerância do indivíduo. Posteriormente, esta definição foi adaptada para considerar ainda a concentração do componente ativo do fármaco, e o tempo necessário para a entrada do fármaco no eritrócito (WHO, 2010a). A resistência aos antimaláricos provoca um atraso ou falência na eliminação de formas assexuadas do sangue, o que permite a produção de gametócitos com capacidade para transmitir o genótipo resistente. Considera-se existir multirresistência quando *P. falciparum* é resistente a mais do que dois fármacos antimaláricos de famílias e modos de ação diferentes.

A seleção de parasitas resistentes aos antimaláricos desenvolve-se em duas fases: na primeira fase, um evento espontâneo e ao acaso provoca uma mutação que confere resistência a um fármaco, oferecendo ao parasita uma vantagem de sobrevivência; numa segunda fase, os parasitas resistentes são selecionados pela pressão farmacológica e multiplicam-se, resultando numa população que já não é sensível ao fármaco (WHO,

2010a). Este mecanismo mutacional parece acontecer independentemente do fármaco, sendo necessário em algumas ocasiões apenas uma mutação pontual, múltiplos eventos de forma independente, ou mudança no número de cópias de um determinado gene ligado à resistência. A exposição do parasita a uma dose subterapêutica do fármaco promove e acelera a seleção destes mutantes, principalmente em doentes não imunes e de zonas de baixa endemicidade (WHO, 2010a; Roper *et al.*, 2004)

Múltiplos fatores contribuem para o aparecimento de resistências, entre os quais: características do fármaco, padrão de utilização do tratamento, fatores ligados ao hospedeiro humano, características do parasita e do vetor, e determinantes ambientais (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

O primeiro fármaco com casos de resistência confirmados foi a cloroquina no final da década de 1950, simultaneamente, na fronteira entre Tailândia e Camboja, e na Colômbia, determinado por uma emergência independente de mutantes nestas duas regiões. Posteriormente, a dispersão destes mutantes resistentes foi rápida, as estirpes asiáticas chegaram a África Oriental em 1978, e em 1989 a resistência à cloroquina já estava presente em todo o continente. As consequências desta dispersão foram catastróficas, com um aumento da morbidade e mortalidade em todo o continente africano e a necessidade de uma mudança radical nos programas de controlo da malária. Atualmente, estudos da eficácia de cloroquina em 30 países revelam que este fármaco é apenas eficaz na América central, apresentando taxas de falência terapêutica entre os 10 e 100% no continente africano. Desde a suspensão da sua utilização na última década do século XX tem-se assistido a sinais de regressão da resistência nalgumas áreas do globo, mas a sua reintrodução não é recomendada (WHO, 2010a). A amodiaquina, um fármaco da mesma família da cloroquina, é atualmente utilizado como combinação com artesunato (ASAQ), sendo as taxas de falência desta combinação dependentes da eficácia da amodiaquina.

A resistência à sulfadoxina-pirimetamina foi inicialmente reportada na fronteira entre a Tailândia e o Camboja em meados da década de 1960, tendo-se estendido até ao continente africano (com início na África Oriental e posterior dispersão para o resto do continente) em finais dos anos 80. Esta combinação é considerada atualmente uma monoterapia devido ao mecanismo de ação na mesma via metabólica dos dois fármacos

(antifolatos). As taxas de falência reportadas para este tratamento são elevadas no continente africano (18.7-52.8%), onde o fármaco foi extensivamente utilizado para o tratamento da malária resistente à cloroquina e onde se verificou uma rápida emergência de resistências em 1-2 anos. A eficácia da combinação com artesunato (AS-SP) correlaciona-se com a eficácia de SP. Apesar de existir uma ligeira redução na resistência reportada aos antifolatos, a resistência cruzada com o cotrimoxazol e o facto de existir circulação extraoficial de SP em monoterapia em muitos países tem mantido a pressão seletiva do fármaco. Atualmente, a SP é utilizada, em muitos países, no tratamento preventivo intermitente da grávida e, também por vezes, em crianças, sendo aceite que continua a ser efetivo em casos de resistência moderada (WHO, 2010a).

Os primeiros casos de resistência à mefloquina foram observados no final da década de 80 na fronteira do Camboja e Tailândia (Webster *et al.* 1985), extendendo-se posteriormente para o Vietnã. A mefloquina tinha sido extensamente utilizada até essa data no tratamento da malária resistente a CQ e SP. Estudos moleculares sugerem que a resistência à mefloquina ocorreu em múltiplos eventos independentes nestas regiões (Vinayak *et al.*, 2010) e que a seleção de resistência a este fármaco a nível molecular é relativamente rápida. Em África, a existência de parasitas resistentes foi demonstrada mediante estudos com recurso a marcadores moleculares (amplificação do gene *pfmdr1*), o que estaria associado à falência terapêutica (Witkowski *et al.*, 2010). Estudos de eficácia mostraram baixas taxas de falência terapêutica. Na área do Sudeste Asiático, onde ASMQ é usado ainda como tratamento de primeira linha em algumas regiões, a resistência à mefloquina encontra-se já disseminada (WHO, 2010a; Phompradit *et al.*, 2014).

A utilização de atovaquona-proguanil é atualmente limitada à profilaxia de viajantes devido ao seu elevado preço. Mutações únicas no *citocromo b* (*pfcytb*) estão associadas a uma menor eficácia do fármaco e têm sido descritas em casos de falência terapêutica em numerosos países africanos (Wichman *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2006).

1.4.2. Resistência aos derivados da artemisinina

Os derivados da artemisinina são rapidamente eliminados e atuam contra todas as etapas no ciclo da malária, incluindo os trofozoítos, anéis e gametócitos (menos eficaz

contra estes últimos). Em monoterapia, estes fármacos estão associados a taxas de falência terapêutica de 48% com três dias de tratamento, que se reduzem para 10% e 2% com cinco e sete dias, respetivamente (Li *et al.*, 1994). Estes resultados são devidos ao rápido efeito e eliminação do fármaco, pelo que a exposição a doses subterapêuticas ou a ciclos curtos poderia aumentar a pressão para a emergência de resistências, apesar da janela temporal para exercer esta pressão ser mais curta do que com os outros antimaláricos. Por este motivo, a OMS recomenda desde 2001 que estes derivados sejam administrados com outros fármacos de semi-vida prolongada e mecanismo de ação diferente (WHO, 2001). A taxa de eliminação parasitária, um parâmetro estudado em ensaios *in vivo*, parece encontrar-se estreitamente relacionada com a eficácia do derivado da artemisinina devido ao seu rápido início de acção (Vijaykadga *et al.*, 2012).

Em algumas províncias da Tailândia e no Camboja, mesmo verificando-se uma elevada taxa de resistência à mefloquina, a combinação ASMQ em dois ou três dias de tratamento foi considerada tratamento de primeira linha para malária por *P. falciparum* em 1995 e 2000, respetivamente. Estes dois países monitorizam a eficácia terapêutica dos antimaláricos em múltiplos locais sentinela desde 2001.

Dois estudos independentes na fronteira entre a Tailândia e o Camboja, publicados em 2006, reportaram no início da década de 2000 taxas de falência entre 14,3-21,4% com a utilização de ASMQ (Denis *et al.*, 2006a; Vijaykadga *et al.*, 2006). Simultaneamente, estudos realizados entre 2001 e 2004 na província de Battambang no noroeste do Camboja, revelaram ainda taxas de falência terapêutica de 13,5-28,9% com AL, assim como presença de parasitémia ao 3º dia em 13,8-32,7% (Denis *et al.*, 2006b; WHO, 2010a). Estes relatos levantaram o receio de ser o primeiro sinal de resistência aos ACT numa região onde tradicionalmente se identificaram os primeiros casos de resistências aos outros antimaláricos (Wongsrichanalai *et al.*, 2008). Em parte, estes resultados podiam ser explicados pela resistência à mefloquina existente desde finais da década de 1980 nessa área, e ainda pela resistência cruzada da lumefantrina com a mefloquina. No entanto, estudos posteriores, retrospectivos, confirmaram que entre 1997 e 2007 a velocidade de eliminação dos parasitas era mais lenta e existia um maior número de falências terapêuticas num número crescente de doentes (Lim *et al.*, 2010; Vijaykadga *et al.*, 2012). O que indica

que a presença de parasitas resistentes aos derivados da artemisinina na população possa ser anterior a 2008.

Na tentativa de impedir a dispersão de parasitas resistentes, o tratamento com derivados da artemisinina em monoterapia foi desaconselhado pela OMS de forma oficial em 2007 (resolução WHA60.18) e múltiplos esforços tem sido desenvolvidos para conter a ameaça, recolhidos no *Global Plan for Artemisin Resistance Containment* (WHO, 2011) e *Emergency response to artemisin resistance in the Greater Mekong subregion* (WHO, 2013b).

A primeira definição aceite pela OMS de resistência parcial às artemisininas (Tabela II, WHO, 2011) baseava-se nos dados fornecidos pelos estudos de eficácia terapêutica, uma avaliação *in vivo* da resposta parasitológica e clínica ao tratamento de malária não complicada, e através dos ensaios clínicos da utilização de artesunato em monoterapia.

Tabela II. Primeira definição de trabalho de resistência às artemisininas (WHO, 2011)

Resistência suspeita Atraso na taxa de eliminação parasitária, objetivada com uma proporção de doentes com parasitemia no dia 3 de tratamento com um ACT $\geq 10\%$
Resistência confirmada Falência do tratamento com a utilização de um derivado de artemisinina em monoterapia durante sete dias, em concentração plasmática adequada, evidenciado pela persistência de parasitas no dia 7 de tratamento ou pela presença de parasitemia no dia 3 e recrudescência aos 28-42 dias

Esta definição foi discutida por vários autores, tendo sido considerada apenas uma definição em atualização (Krishna *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2013), visto não ser equiparável a qualquer outra definição clássica de resistência a fármacos, e pela presença de múltiplos fatores que podem interferir com a taxa de eliminação parasitária para além da eficácia do derivado da artemisinina (Figura 4). São apontados como contributivos para o aparecimento de resistência a presença de práticas terapêuticas desadequadas, uso de tratamentos com artemisininas em monoterapia, falta de adesão aos regimes com ACTs, presença de fármacos contrafeitos com doses subterapêuticas, entre outros (White *et al.*, 2014).

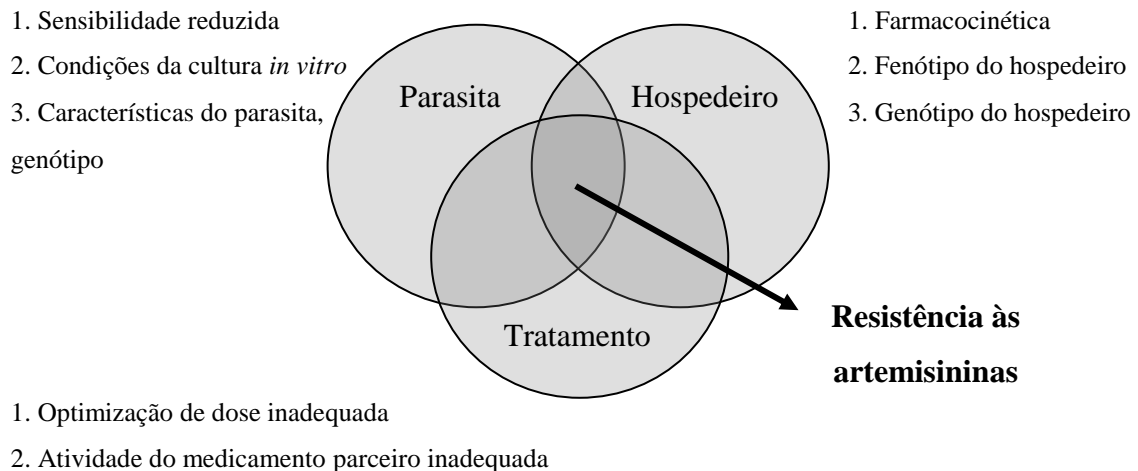


Figura 4. Fatores que influenciam a definição de resistência às artemisininas (adaptado de Krishna *et al.* 2013)

Por outro lado, a definição de atraso na taxa de eliminação parasitária não era consensual, e no geral definia-se por uma taxa de eliminação duas vezes a taxa de eliminação de parasitas conhecidamente sensíveis ao fármaco (White *et al.*, 2014).

Recentemente a OMS (2014b) colmatou algumas das dúvidas existentes na definição em vigor de resistência às artemisininas, incluindo critérios mais específicos sobre os limiares de eliminação parasitária (5 horas), e pela primeira vez, incluindo um marcador molecular (mutações na proteína *kelch* K13) na definição de resistência (Tabela III).

Tabela III. Definição em vigor de resistência parcial às artemisininas (WHO, 2014b)

Resistência suspeita

- $\geq 5\%$ de doentes portadores de mutações da proteína *kelch* K13 associadas a resistência *ou*
- $\geq 10\%$ de doentes com parasitemia persistente por microscopia no dia 3 após tratamento com ACT ou artesunato em monoterapia *ou*
- $\geq 10\%$ de doentes com meia-vida de eliminação parasitária ≥ 5 horas após tratamento com ACT ou artesunato em monoterapia.

Resistência confirmada

$\geq 5\%$ de doentes portadores de mutações da proteína *kelch* K13 associadas a resistência após tratamento com ACT ou artesunato em monoterapia, associado quer a presença de parasitemia persistente por microscopia no dia 3, quer a uma meia-vida de eliminação parasitária ≥ 5 horas.

Atualmente verifica-se resistência as artemisininas em cinco países da Região do Grande Mekong (Tabela IV).

Tabela IV. Resumo da situação de resistência aos derivados da artemisinina na região do Grande Mekong (adaptado de WHO, 2014b)

Países	Ano de emergência	AL		ASMQ		DHA-PQ	
		D3+	FT	D3+	FT	D3+	FT
Cambodja	2001*	◆	◆	◆	◆	◆	◆
Tailândia	2001*	◆	◆	◆	◆		
Myanmar	2001*	◆	□	◆	□	◆	□
Vietnam	2009					◆	□
Laos	2013	◆	□				

*mediante o uso retrospectivo de dados e marcadores moleculares, AL: artemeter+lumefantrina, ASMQ: artesunato+mefloquina, DHA-PQ: dihidroartemisinina+piperquina, D3+: persistência de parasitemia no dia 3, FT: falência terapêutica, ◆ >10% de casos, □ <10% de casos

1.5. MONITORIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ANTIMALÁRICOS

Devido ao limitado arsenal terapêutico, a OMS recomenda a monitorização por rotina da eficácia terapêutica dos fármacos antimaláricos como parte necessária do programa de vigilância que orienta a política terapêutica da malária, considerando-se necessário uma mudança de tratamento de primeira linha quando a taxa de falência global é superior a 10% dos casos tratados (WHO, 2010a).

O principal objetivo na monitorização de resistência aos antimaláricos é a deteção de falências no tratamento, pela presença de parasitas resistentes, antes que haja uma dispersão destes na população, incrementando a morbidade e mortalidade. Tradicionalmente, os métodos de estudo da eficácia farmacológica têm sido baseados na combinação dos resultados clínicos *in vivo* derivados dos ensaios clínicos, assim como dos resultados *in vitro* dos testes de suscetibilidade e da análise farmacocinética (Lin *et al.*, 2010). Recentemente, os marcadores moleculares, são apontados como uma arma que permite o reconhecimento de resistências antes da sua propagação, com a possibilidade de serem realizados estudos a larga escala e em pouco tempo (Abdul-Ghani *et al.*, 2014).

1.5.1. Ensaios *in vivo*

A eficácia dos antimaláricos é avaliada pela resposta *in vivo* ao fármaco, sendo considerada a técnica *gold standard*, os resultados das quais vão influenciar a política antimalárica.

Os estudos de eficácia terapêutica baseiam-se na resposta clínica e parasitológica, num período de tempo definido, de um indivíduo com infecção sintomática por *P. falciparum* ao qual é administrado uma dose padrão de um determinado fármaco antimalárico.

A resposta é classificada em quatro grupos, independentemente da intensidade de transmissão (WHO, 2009):

- resposta parasitológica e clínica adequada: ausência de parasitemia no dia 28 (ou dia 42), independentemente da temperatura axilar, em doentes sem critérios prévios de falência terapêutica;
- falência terapêutica precoce: sinais de malária severa no dia 3, parasitemia no dia 2 superior ao dia 0, parasitemia persistente no dia 3 e temperatura $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$, e parasitemia no dia 3 superior em 25% à parasitemia do dia 0.
- falência clínica tardia (entre o 4º e 28/42º dia): malária severa na presença de parasitemia entre os dias 4 e 28 (ou 42) em doentes sem falência precoce, ou parasitemia em qualquer dia entre dia 4 e 28 (42) e temperatura $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$.
- falência parasitológica tardia (a partir do 7º dia): parasitemia entre os dias 7 e 28 (42) com temperatura $< 37.5^{\circ}\text{C}$ e sem critérios de falência precoce ou clinica tardia.

Atualmente o tempo de seguimento clínico e parasitológico mínimo é de 28 dias (nalguns casos 42 dias) e é necessário incluir a genotipagem por PCR para distinção entre recrudescência e reinfeção (WHO, 2009). Estes ensaios podem ser ainda afetados por outros fatores que contribuem para a parasitemia recorrente em países endêmicos, como a falta de cumprimento terapêutico, drogas de contrafação ou de pouca qualidade, variações farmacocinéticas individuais e diferentes graus de imunidade do hospedeiro (Abdul-Ghani *et al.*, 2014). Para mitigar os efeitos da imunidade, particularmente em áreas de elevada transmissão, estes estudos são realizados preferencialmente em crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2009). São ainda de difícil aplicação em áreas de baixa

transmissão pela dificuldade em recrutar indivíduos (WHO, 2010a), pelo que se recomenda a realização cada 2-3 anos em estudos multicêntricos e multinacionais, associado à pesquisa de marcadores moleculares (WHO, 2009).

Devido aos múltiplos fatores de confusão, a falência da terapêutica no ensaio *in vivo* não significa necessariamente resistência ao fármaco utilizado, e outros métodos devem ser utilizados para confirmar esta resistência.

1.5.2. Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* baseiam-se na cultura de estirpes de *P. falciparum* sob diversas concentrações de fármacos, sendo avaliada a sensibilidade intrínseca do parasita ao fármaco mediante a observação da inibição da maturação para esquizontes (WHO, 2010a). Estes ensaios permitem ultrapassar fatores de confusão relacionados com o hospedeiro e com a farmacocinética (Abdul-Ghani *et al.*, 2014).

Os ensaios *in vitro* permitem: estudo de resistência cruzada entre antimaláricos; estabelecer a sensibilidade basal de um fármaco que permita monitorizar a sua evolução após a sua introdução terapêutica; monitorização espacial e temporal da suscetibilidade do parasita ao fármaco, revelando de forma precoce mudanças nesta sensibilidade antes do aparecimento de resistência clínica; validação de marcadores moleculares através da correlação com os resultados *in vitro*.

No geral, estes ensaios medem a concentração do fármaco na qual 50% do crescimento do parasita é inibido (IC_{50}) em comparação com uma cultura controlo, obtendo-se assim um valor quantitativo. As limitações destes ensaios prendem-se na multiplicidade de métodos e testes diferentes existentes, muitas vezes dificilmente comparáveis no tempo e entre locais de estudo. Por outro lado, verificou-se que os valores de IC_{50} para artesunato ou dihidroartemisinina eram idênticos em estirpes resistentes e sensíveis (Witkowski *et al.*, 2013b), não sendo portanto um parâmetro discriminatório. Atualmente preconiza-se o RSA (*ring-stage survival assay*) como medida de susceptibilidade *in vitro* para caracterizar a resposta aos antimaláricos derivados da artemisinina. Este parâmetro mede a sobrevivência de parasitas que foram expostos ao fármaco entre as 3 e as 9 horas após invasão, numa dose correspondente à terapêutica (Witkowski *et al.*, 2013b; Amaratunga *et al.*, 2014).

1.5.3. Marcadores moleculares de resistência

A utilização de marcadores moleculares de resistência aos fármacos tem sido uma prioridade nos últimos anos e tem permitido um melhor conhecimento sobre os mecanismos de resistência, a sua origem geográfica e a sua dispersão, permitindo uma identificação mais precoce de populações de parasitas resistentes. Estes marcadores baseiam-se na presença de mutações genéticas que conferem resistência a um fármaco utilizado no tratamento.

A utilização de marcadores moleculares permite o estudo de um maior número de amostras e pode ajudar na deteção de resistência antes da existência de falência terapêutica, evitando os efeitos de confusão ligados ao hospedeiro e ambientais (Abdul-Ghani *et al.*, 2014).

A pesquisa de marcadores baseia-se em técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) específicas para mutação, de elevada sensibilidade pela utilização de *primers* específicos para a sequência pretendida do gene envolvido. Posteriormente foram desenvolvidas técnicas de PCR associadas ao uso de enzimas de restrição específicas que permitiam a separação de fragmentos com diferentes polimorfismos, o que a tornava uma técnica mais específica. O desenvolvimento de técnicas *multiplex* permitiu a deteção de múltiplos SNP, facilitando o uso dos marcadores moleculares na vigilância da resistência a fármacos. Vários métodos de PCR *real time* têm sido desenvolvidos, assim como *microarrays* de ADN, permitindo o processamento de um maior número de amostras em menor tempo.

Um problema que se coloca no estudo através da genotipagem de *P. falciparum* é a presença de infeções policlonais, em que se torna difícil determinar a proporção de diferentes genótipos e se as mutações emergem todas de um mesmo clone.

A associação dos marcadores moleculares com o resultado do tratamento tem sido evidenciado na literatura, podendo-se assim concluir pela existência de um maior risco de falência terapêutica na sua presença (Picot *et al.*, 2009).

Atualmente existem marcadores moleculares mais ou menos robustos para a estimar a resposta à maioria dos fármacos antimaláricos prévios à era dos ACTs (Tabela V).

Tabela V. Marcadores moleculares conhecidos para fármacos antimaláricos (adaptado de Lin *et al.*, 2012)

Fármaco	Data de introdução	Primeira resistência reportada	Primeiro marcador descrito	Gene
Cloroquina	1945	1957	2001	<i>pfprt; pfmdr1</i>
Primetamina			1996	<i>pfdhfr</i>
Sulfadoxina	1967	1967	1997	<i>pfdhps</i>
Mefloquina	1985	1989	2004	<i>pfmdr1</i>
Atovaquona	1995	1996	2000	<i>pfcytb</i>

No que diz respeito aos derivados das artemisininas, a pesquisa de marcadores moleculares tem tido um especial interesse como instrumento de detecção precoce de resistência. Neste sentido, em 2012, Cheesman *et al.* identificaram uma região genómica no cromossoma 13 que determinava cerca de 35.2% do componente hereditário associado a parasitas com uma taxa de eliminação mais lenta no Camboja, Tailândia e Laos. Apesar de promissor, a avaliação mais pormenorizada deste *loci* não foi, ainda, reportada.

Em 2014, Arie *et al.* descrevem pela primeira vez um polimorfismo presente em clones parasitários adaptados para sobreviver a altas doses de artemisininas *in vitro* e, posteriormente, presente em amostras clínicas de parasitas resistentes à artemisinina na região do Grande Mekong. Desta forma os investigadores descrevem a presença de polimorfismos pontuais (SNPs) no gene que codifica a proteína *kelch* K13 (gene PF3D7_1343700) de *P. falciparum* como um novo marcador molecular de resistência às artemisininas, sendo citado pela OMS como uma nova ferramenta que pode ajudar na monitorização desta ameaça (WHO, 2014a). Recentemente as mutações descritas foram incluídas na definição de resistência parcial às artemisininas, tal e como descrito na Tabela III (WHO, 2014b).

1.6. MALÁRIA EM MOÇAMBIQUE E ANGOLA

A malária é responsável por mais de 10% da mortalidade das crianças com menos de cinco anos em 33 países africanos e três países fora de África, entre os quais Moçambique e Angola (WHO, 2013). Estes dois países de língua portuguesa localizam-se em áreas de elevada mortalidade por malária (Figura 5).

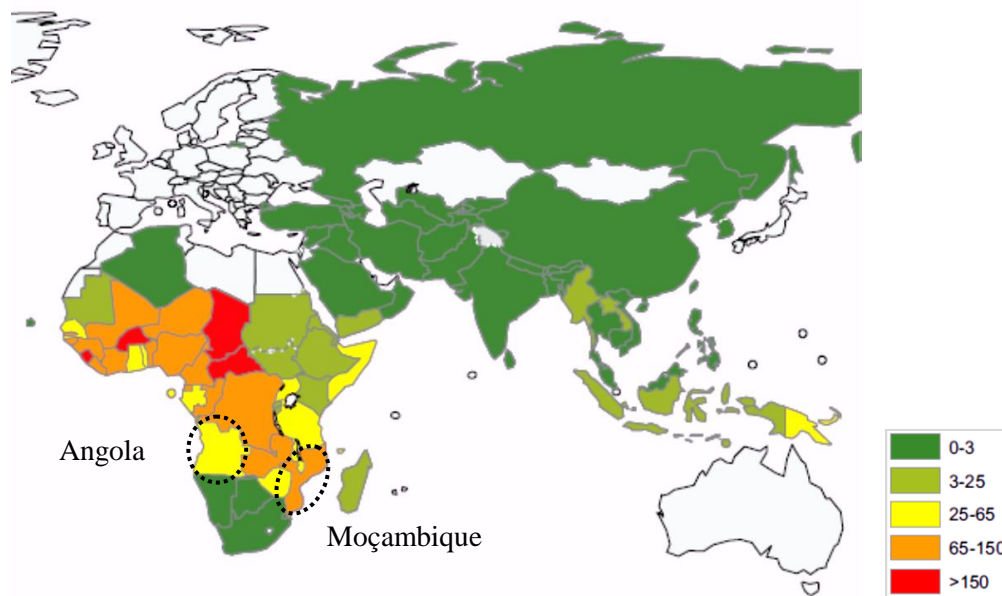


Figura 5. Mortalidade por malária estimada por cada 100 000 habitantes; localização geográfica de Moçambique e Angola (Adaptado de *Roll Back Malaria Annual Report*, 2013)

1.6.1. Moçambique

A República de Moçambique situa-se na costa oriental de África e tem uma população estimada de 25,2 milhões de habitantes. A malária é endémica em todo o país, variando de zonas hiper-endémicas ao longo do litoral, zonas meso-endémicas nas terras planas do interior e de algumas zonas hipo-endémicas nas terras altas do interior. Vários fatores contribuem para esta endemicidade, desde as condições climáticas e ambientais como as temperaturas favoráveis e os padrões de chuvas, bem como locais propícios para a reprodução do vetor, a situação sócio económica das populações relacionadas com a pobreza, habitações inapropriadas e acesso limitado aos meios de prevenção.

A malária é o principal problema de saúde do país, representa cerca de 30% da mortalidade hospitalar e estima-se que a prevalência da infeção em crianças com idade inferior a cinco anos é de 35%, atingindo os 80% em algumas áreas do país (DHS 2011). *Plasmodium falciparum* é a espécie responsável por mais de 90% dos casos de malária em Moçambique, enquanto *P. malariae* e *P. ovale* são responsáveis por 9% e 1%, respetivamente.

As atividades de controlo da malária remontam da década de 50, quando se deu o início ao programa global de erradicação da malária. Contudo, só a partir de 1982 foi criado o Programa Nacional de Controlo da Malária. Moçambique substituiu em 2002 o uso da cloroquina por amodiaquina (AQ) + sulfadoxina-pirimetamina (SP) com solução intermédia até à chegada de tratamentos com derivados da artemisinina. Em 2004 foi adotado oficialmente o tratamento com ACTs na combinação AS-SP. Em 2009, o tratamento de primeira linha foi revisto devido ao uso de SP no tratamento intermitente e preventivo de crianças e grávidas e às elevadas taxas de resistência a SP, pelo que a combinação AL (Coartem®) foi adotada como tratamento de primeira linha da malária por *P. falciparum* não complicada (WHO, 2013a). O Plano Estratégico da Malária 2012-2016 prevê reduzir a morbilidade e mortalidade por malária para metade em 2016 comparando com os níveis de 2009.

1.6.2. Angola

A República de Angola situa-se na costa ocidental africana e tem uma população estimada de cerca de 19,6 milhões de habitantes. A malária é endémica em todas as províncias do país, com uma zona híper-endémica no norte do país (ao longo da fronteira com a República Democrática do Congo), sendo o restante território zona meso-endémica.

A malária é a primeira causa de morte no país e estima-se uma prevalência de malária em crianças com menos de cinco anos em até 16% nas zonas híper-endémicas do norte (DHS, 2011). *Plasmodium falciparum* é responsável por mais de 90% dos casos de malária em Angola, enquanto *P. vivax* é responsável por cerca de 5-7% dos casos.

O Governo de Angola aderiu em 1998 à iniciativa *Roll Back Malária*, tendo desde então sido definidas e adotadas políticas e estratégias para controlo da doença. Angola

adotou oficialmente no ano 2006 o tratamento com ACTs, inicialmente na combinação ASAQ e posteriormente AL (Coartem®) como tratamento de primeira linha da malária por *P. falciparum* não complicada (WHO, 2013a). O Plano Estratégico do Programa Nacional de Controlo da Malária 2011-2015 propunha a redução em 80% do impacto da malária em Angola, em comparação com os dados de 2006.

1.7. OBJETIVOS

Objetivo Geral

A presença de marcadores moleculares de susceptibilidade às artemisininas é uma ferramenta fundamental na monitorização da dispersão de parasitas resistentes para regiões fora do Sudeste Asiático, sobretudo para África. A caracterização da presença destes marcadores em dois países de língua portuguesa, Moçambique, na África Oriental, e Angola, na África Ocidental, que utilizam oficialmente como tratamento de primeira linha ACTs desde 2004 e 2006, respetivamente (WHO, 2013a), poderá aportar um melhor conhecimento sobre a possível dispersão de parasitas com capacidade genética de resistência às artemisininas fora das áreas atualmente descritas na literatura.

Pretende-se assim estudar a presença de polimorfismos associados à resistência a derivados da artemisina no gene que codifica a proteína *kelch* K13 em *P. falciparum*, antes e depois da introdução desta classe terapêutica, em Moçambique e Angola.

Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de polimorfismos pontuais de resistência às artemisininas no gene PF3D7_1343700 que codifica a proteína *kelch* K13 de *P. falciparum*;
- Avaliar a presença de novos polimorfismos no gene PF3D7_1343700 não reportados previamente;
- Relacionar a presença destes polimorfismos à utilização de ACT, mediante o estudo de amostras anteriores e posteriores à introdução desta classe terapêutica;
- Avaliar as mudanças estruturais e funcionais dos polimorfismos encontrados na proteína resultante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado neste estudo consiste em isolados de ADN de *Plasmodium falciparum* previamente identificados e conservados a -20°C no IHMT, da República de Moçambique e da República de Angola. As amostras encontravam-se identificadas em localidade de colheita e ano. Foram utilizados dois periodos temporais em relação com a introdução de forma oficial da utilização de combinações com derivados das artemisininas como tratamento da malária nestes países.

As amostras de sangue dos doentes foram colhidas por punção digital e conservadas a seco, em papel de filtro e enviadas para o IHMT, até à extração de ADN. A extração de ADN a partir de cada amostra sanguínea foi realizada com recurso a o método de extração com Chelex (Plowe *et al.*, 1995). Para a identificação de *P. falciparum* aplicou-se um método de *nested*-PCR (Singh *et al.*, 1999). Apenas as amostras que foram positivas para *P. falciparum* foram analisadas. Posteriormente as amostras foram armazenadas a -20°C no IHMT.

Os estudos originais foram aprovados pelos comités de ética dos diversos países, e foi sempre fornecido consentimento informado aos participantes. Os estudos originais encontram-se publicados na literatura especializada (Varandas *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Fortes *et al.*, 2011; Lobo *et al.*, 2014).

Este estudo foi desenvolvido nas Unidades de Ensino e Investigação de Clínica Tropical e Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, e obteve a dispensa de aprovação do Comité de Ética desta instituição.

2.2. PESQUISA DE POLIMORFISMOS NO GENE PF3D7_1343700

No âmbito do trabalho realizado foi analisado o gene PF3D7_1343700, de 2181bp, que codifica a proteína *kelch* K13, para pesquisa de polimorfismos.

2.2.1. Otimização da reação de amplificação por PCR

A técnica de PCR permite a amplificação de ADN através da utilização de uma polimerase de ADN (*Taq polymerase*) que se une a extremos 3-OH livres fornecidos por *primers* (sequência de oligonucleotídeos de pequenas dimensões 12-25 pares de bases complementares a sequências alvo específicas no DNA molde), situados em regiões adjacentes (3' e 5') de cada uma das cadeias da dupla hélice da sequência de DNA a amplificar. Esta técnica permite a síntese exponencial de cópias do molde de DNA.

Para este estudo foram desenhados dois pares de *primers* (Tabela VI) que continham os codões desde a posição 460 a 594 do gene PF3D7_1343700 (anexo 1), tendo em conta as considerações seguintes: a) Temperatura de dissociação do par primer/sequência alvo; b) Conteúdo em Guanina/Citosina (G/C); c) Complementaridade da sequência do primer – com recurso ao OligoAnalyzer (www.idtdna.com/html/analysis/).

Tabela VI. Características dos primers utilizados no estudo

Primer	Reação	Sequência	Fragmento
K13_PCR_F	PCR	GTGTAGAATATTTAAATTCG	445bp
K13_PCR_R		ATAGAATTTAATCTCTCACC	
K13_Nested_F	Nested	GAAAGAAGCAGAATTTTATGG	591bp
K13_Nested_R		GCTCCTGAACTTCTAGCTTC	

2.2.2. Amplificação do fragmento do gene por PCR

Numa primeira reacção é amplificado um fragmento de 520bp, sendo utilizados os *primers* K13_PCR_F e K13_Nested_R. A mistura de reacção (kit comercial Promega®) e as condições de amplificação estão detalhadas nas Tabela VII e Tabela VIII.

Tabela VII. Mistura da primeira reação de PCR

Reagentes		Concentração
1.	H2O	-
2.	Buffer	1X
3.	MgCl ₂	2.0 mM
4.	dNTP	0.2 mM
5.	Primer K13_PCR_F	300 nM
6.	Primer K13_Nested_R	300 nM
7.	Taq polimerase	0.2 U/20µl
8.	DNA (amostra)	±2ng/µl

Tabela VIII. Condições de amplificação da primeira reação de PCR

Ciclo	Temperatura	Tempo (min)	Nº ciclos
1 (desnaturação inicial)	94°	3:00	1
2 (desnaturação)	94°	1:00	10
3 (hibridação)	55°	0:30	
4 (extensão)	72°	1:00	
5 (desnaturação)	94°	1:00	35
6 (hibridação)	45°	0:30	
7 (extensão)	72°	1:00	
8 (extensão final)	72°	3:00	1
9 (conservação)	4°	...	

Nalguns casos foi utilizado um semi-*nested* mediante o uso do *primer* K13_PCR_R em conjunto com o *primer* K13_PCR_F (fragmento 445bp). A mistura de reação da segunda reacção de PCR foi idêntica à descrita na Tabela VII. À mistura foram adicionados 0,5µl/10µl de produto da primeira reacção. As condições de amplificação do semi-*nested* encontram-se na Tabela IX.

Tabela IX. Condições de amplificação da segunda reação de PCR

Ciclo	Temperatura	Tempo (min)	Nº ciclos
1 (desnaturação inicial)	94°	3:00	1
2 (desnaturação)	94°	1:00	45
3 (hibridação)	55°	0:30	
4 (extensão)	72°	1:00	
5 (extensão final)	72°	3:00	1
6 (conservação)	4°	...	

2.2.3. Confirmação de produto por eletroforese em gel de agarose

Para verificar presença de banda única e tamanho esperado, os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo foi visualizado sob luz UV e fotografado.

2.2.4. Sequenciação do ADN

Após purificação recorrendo ao kit EXOSAP-IT PCR CLEANUP[®], seguindo as recomendações do fabricante. O produto foi enviado para sequenciação na STAB Vida,

Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda, usando o método de Sanger. As amostras com polimorfismos foram reamplificadas e resequenciadas para confirmação.

O alinhamento de sequências foi realizado mediante a aplicação Multalin¹ (Corpet, 1988) usando como referência a estirpe de *P. falciparum* 3D7. A sequência de nucleótidos foi comparada com a depositada na base de dados PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) para pesquisa de SNPs, entre eles os associados a resistência à artemisinina: M476I, Y493H, R539T, I543T, C580Y (Ariey *et al.*, 2014).

2.2.5. Estrutura e função

A previsão da estrutura proteica foi realizada mediante a ferramenta *on line* RaptorX² (Källberg *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011) e a previsão de alterações funcionais desta estrutura proteica e dos polimorfismos foi realizado mediante a ferramenta *on line* PROVEAN³ (Choi *et al.*, 2012).

¹ Disponível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/>

² Disponível em: <http://raptorx.uchicago.edu/>

³ Disponível em: <http://provean.jcvi.org/>

3. RESULTADOS

3.1. Características das amostras

Foram seleccionadas 200 amostras de ADN de *Plasmodium falciparum* conservadas no IHMT a -20°C, de acordo com os critérios descritos no capítulo anterior. A distribuição espacial e temporal encontra-se resumida na Tabela X e Figura 6.

Tabela X. Distribuição das amostras por província, localidade e ano

País	Ano	Província	Local	Nº amostras	
República de Moçambique	2003-05	Cidade de Maputo	Maputo	50	
	2010-12	Maputo	Boane	34	50
		Cidade de Maputo	Maputo	16	
República de Angola	2003	Luanda	Maianga	50	
	2010	Luanda	Rangel / Maianga	21 / 3	50
		Malanje	Malanje	19	
		Kwanza Norte	Ndalatando	7	

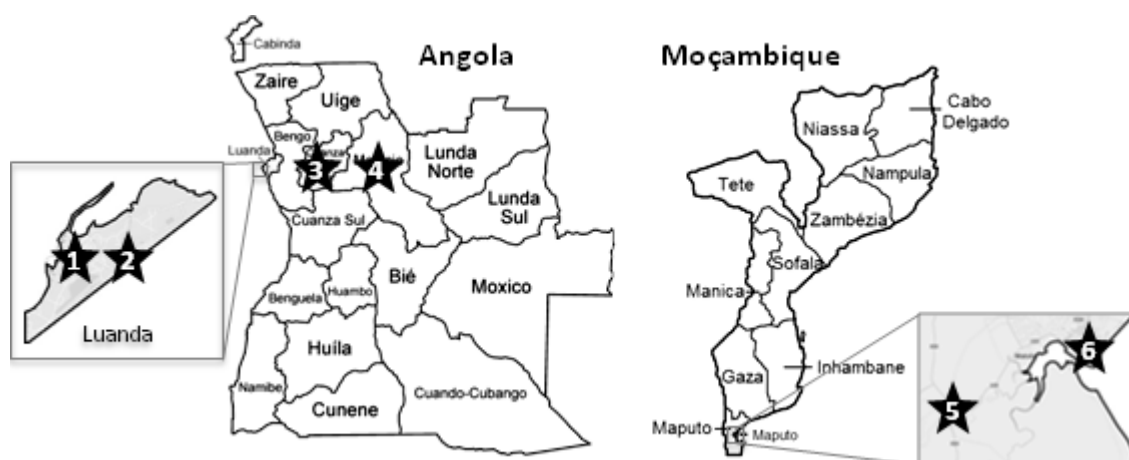


Figura 6. Origem geográfica das amostras. Angola: 1) Maianga (Luanda), 2) Rangel (Luanda), 3) Ndalatando (Kwanza Norte), 4) Malanje; Moçambique: 5) Boane (Maputo), 6) Cidade de Maputo

3.2. Resultados da otimização da reação de amplificação

Os primers desenvolvidos foram testados em várias combinações e diluições de amostra (Figura 7), tendo sido seleccionado por apresentar um melhor perfil de resultados (maior eficiência e banda única) a combinação dos *primers* K13_PCR_F e K13_Nested_R para a

primeira reação de amplificação. Naqueles em que não se demonstrou presença de produto na eletroforese em gel de agarose, foram submetidos a uma amplificação por *semi-nested* com os *primers* PCR_F e R.

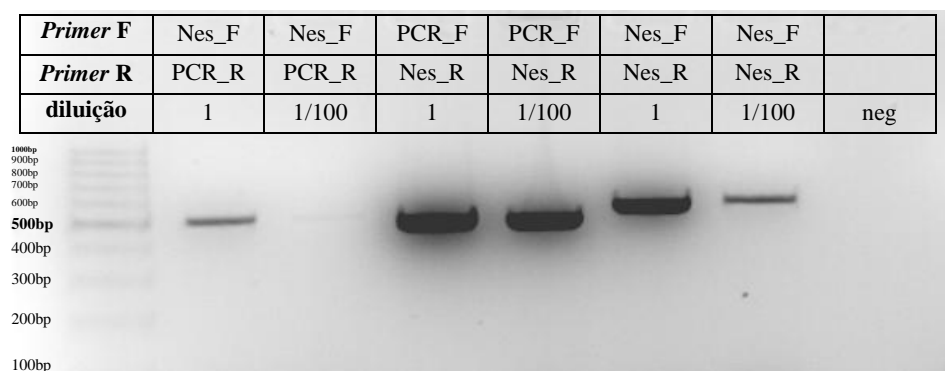


Figura 7. Produto de amplificação mediante o uso de combinações de *primers* e diluições

A Figura 8 mostra um exemplo de produto de amplificação na primeira reação de PCR e ainda um produto de *semi-nested* (2ª PCR), com tamanhos de pares de base concordantes com os pretendidos, 520 e 445, respetivamente.

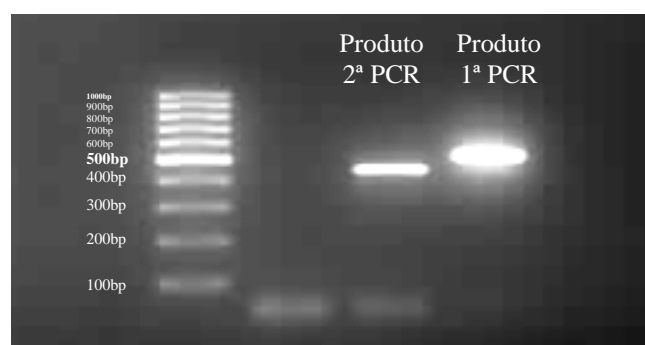


Figura 8. Produto de amplificação de ADN da primeira e segunda reação de PCR

A Tabela XI mostra um resumo das reações de amplificação realizadas nas amostras. Foi necessária a realização de 2º PCR em 5.5% das amostras.

Tabela XI. Resumo das reações de PCR realizadas por grupo de amostras

Grupo amostras	Código	Nº total	1ª PCR	2ª PCR
Moçambique 2003-05	M03	50	50	4
Moçambique 2010-12	M10/12	50	50	0
Angola 2003	A03	50	50	3
Angola 2010	A10	50	50	4

3.3. Presença de polimorfismos no gene *PF3D7_1343700*

No presente estudo, a comparação da sequência de nucleótidos com a estirpe de referência 3D7 permitiu identificar três polimorfismos, um não sinónimo e dois sinónimos (Tabela XII). Dois destes descritos neste trabalho pela primeira vez. O resumo de todas as amostras analisadas encontra-se no anexo 2 e o alinhamento das sequências com polimorfismos no anexo 3.

Tabela XII. Substituição de nucleótidos e aminoácidos dos polimorfismos encontrados

Locus nucleótido	Alelo de ref ^a	Alelo mutado	Tipo mutação	Locus aminoácido	Localização geográfica	Ano
1413	T	C	Sinónima	R471R	Angola (Malanje e Luanda)	2010
1480	G	A	Não sinónima	V494I	Moçambique (Boane)	2010-12
1725	G	A	Sinónima	R575R	Angola (Malanje)	2010

Foram encontrados polimorfismos em cinco das 200 amostras (2,5%), todos em amostras referentes ao período temporal após a introdução oficial do tratamento de primeira linha com ACT, três em Angola e dois em Moçambique (Figura 9).

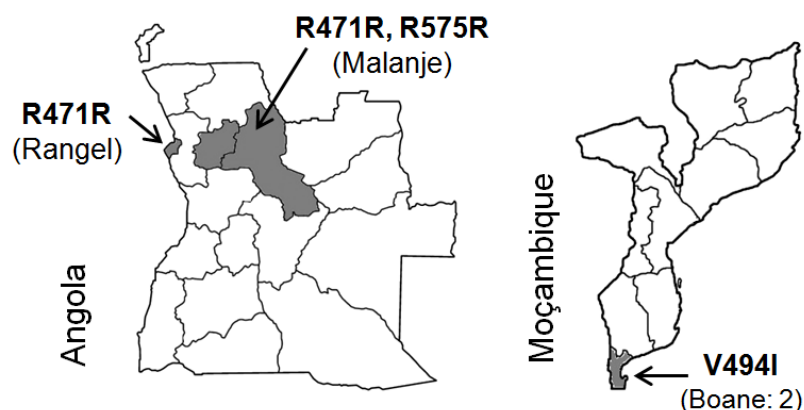


Figura 9. Localização dos polimorfismos encontrados em Angola e Moçambique

Não foram observados os polimorfismos previamente descritos no Sudeste Asiático e associados a resistência às artemisininas, nomeadamente, C580Y, R539T, Y493H e I543T. Também não foi observado o polimorfismo M476I, mutação que foi selecionada *in vitro* sob pressão com artemisininas.

3.4. Avaliação estrutural dos polimorfismos no gene PF3D7_1343700

O gene PF3D7_1343700 codifica na região C-terminal seis motivos *kelch* (entre os codões 439 e 726). Cada um destes motivos é composto por cerca de 50 aminoácidos que formam uma estrutura em folha β composta por quatro fitas e chamada propulsor β . Este motivo *kelch* repete-se em seis unidades, formando uma estrutura circular (Figura 10-A). A estrutura da proteína propulsor *kelch* K13 apresenta homologia com as proteínas humanas KLHL12, KLHL2 e KEAP1 (Ariey *et al.*, 2014). Baseado nesta homologia torna-se possível prever a estrutura secundária e terciária de proteínas recorrendo a ferramentas informáticas de uso livre (Raptor X⁴; Källberg *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011)

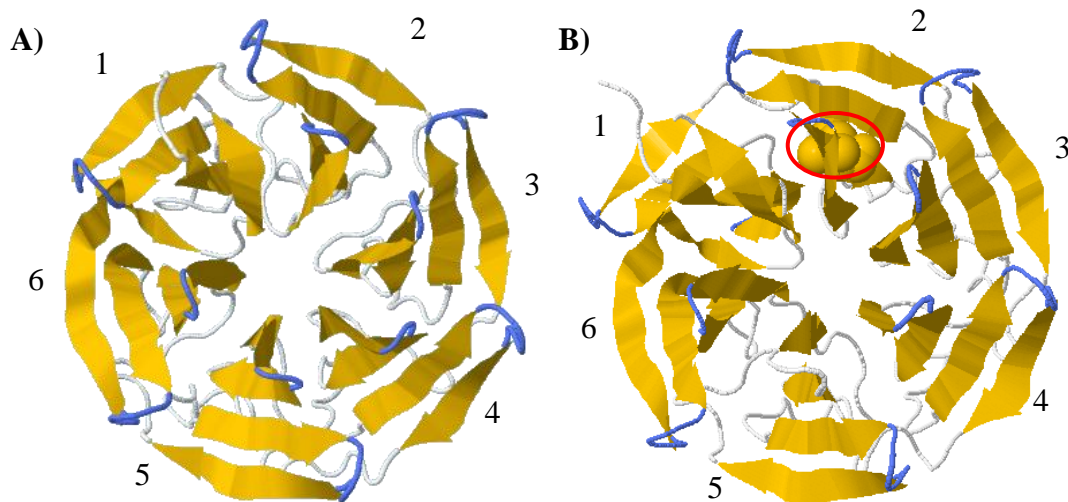


Figura 10. Estrutura do domínio propulsor *kelch* de K13. A) Estrutura tridimensional do domínio propulsor β da proteína *kelch* K13 por homologia com a proteína humana KEAP1; B) Estrutura tridimensional de *kelch* K13 com o polimorfismo V494I.

Neste estudo descrevemos um novo polimorfismo não-sinónimo na posição 494, que se encontra, a nível de estrutura secundária, numa zona organizada de uma folha β na segunda unidade do domínio propulsor β (Figura 10-B). O algoritmo usado pela aplicação Raptor X não prevê que o polimorfismo V494I altere a conformação tridimensional da

⁴ Disponível em: <http://raptorx.uchicago.edu/>

proteína codificada. Os outros dois polimorfismos descritos na posição 471 e 575 conservam a sequência de aminoácidos e a estrutura da proteína.

O alinhamento emparelhado da estrutura derivada da proteína *kelch* 13 *wild type* e da proteína derivada incluindo o polimorfismo V494I mostra-se na Figura 11.

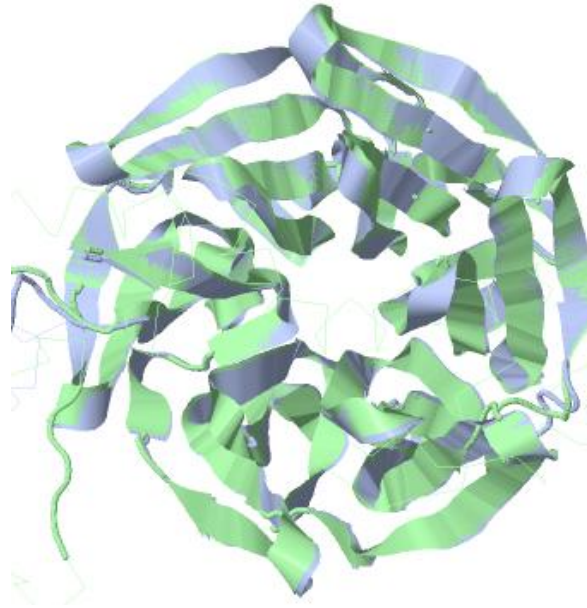


Figura 11. Estrutura tridimensional do alinhamento da proteína *kelch* K13 *wild type* e do polimorfismo V494I mediante o *software* Raptor X (Wang et al., 2011)

3.5. Avaliação funcional dos polimorfismos no gene *PF3D7_1343700*

Com o intuito de prever se as alterações na sequência de aminoácidos provocam alterações relevantes na função biológica da proteína, foi utilizada a ferramenta de *software* PROVEAN⁵ (Choi, 2012). Como foi mencionado anteriormente, a proteína *kelch* K13 apresenta homologia com a proteína humana KEAP1 (Ariey et al., 2014), tendo sido esta utilizada como molde para a previsão funcional.

O polimorfismo V494I apresentou um *score* de -0.744, o que leva a uma previsão funcional neutra na função de *kelch* K13 (Tabela XIII). Os outros dois polimorfismos descritos neste estudo, R471R e R575R, por serem sinónimos não alteram a previsão funcional. Na Tabela XIII é ainda caracterizada a previsão funcional dos polimorfismos

⁵ Disponível em <http://provean.jcvi.org/>

associados com resistência às artemisininas descritos por Ariei (2014), estando em todos os casos associado a uma alteração na função, excepto no caso do polimorfismo R539T cujo *score* encontra-se no limite do *cut-off* considerado.

Tabela XIII. Previsão funcional das estruturas proteicas associadas aos polimorfismos descritos

Locus aminoácido	Locus nucleótido	Alelo de ref ^a	Alelo mutado	Tipo mutação	PROVEAN score	Previsão funcional*
Polimorfismos descritos neste estudo						
R471R	1413	T	C	Sinónima	0.000	neutral
V494I	1480	G	A	Não sinónima	-0.744	neutral
R575R	1725	G	A	Sinónima	0.000	neutral
Polimorfismos associados com resistência às artemisininas (Ariei <i>et al.</i> , 2014)						
M476I	1428	G	A	Funcional	-2.885	deletéria
Y493H	1477	T	C	Funcional	-4.166	deletéria
R539T	1616	G	C	Funcional	-2.489	neutral
I543T	1628	T	C	Funcional	-3.401	deletéria
C580Y	1739	G	A	Funcional	-2.849	deletéria

*Para um *cut-off* de -2.5 o modelo de previsão funcional apresenta uma sensibilidade de 80.4% e especificidade de 78.6%. A precisão do modelo é de 77.9% na utilização em variantes de proteínas não humanas.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Presença de polimorfismos no gene PF3D7_1343700

Este estudo pretendeu pesquisar a presença de polimorfismos no gene PF3D7_1343700, recentemente associado à resistência aos derivados das artemisininas. Para este efeito foi desenvolvida e otimizada uma técnica de reação em cadeia da polimerase que permitiu a amplificação de uma região deste gene (codões 460 a 594). A escolha desta região foi baseada na presença de polimorfismos previamente descritos como associados à resistência (Ariey *et al.*, 2014).

Foram descritos três polimorfismos da proteína propulsor *kelch* K13 neste estudo: V494I, R575R e R471R, sendo os dois primeiros descritos pela primeira vez neste trabalho.

A substituição de uma guanina (G) por uma adenosina (A) no nucleótido 1480 (G1480A) implica uma alteração não sinónima na sequência de aminoácidos na posição 494, com substituição de valina por isoleucina (V494I). Esta mutação situa-se no codão seguinte a uma das mutações atualmente associadas à resistência as artemisininas (Y493H), fazendo as duas parte da mesma folha β na segunda unidade do domínio propulsor β de *kelch* K13. No entanto, a previsão funcional mediante o uso da aplicação PROVEAN (Choi, 2012) da mutação V494I obteve um resultado neutral (*score*=-0.7444), enquanto a mutação Y493H é considerada deletéria pelo mesmo método (*score*= -4.166) (Tabela XIII).

As substituições de nucleótidos timina (T) por citosina (C) (T1413C) e guanina (G) por adenina (A) na posição 1725 (G1725A) não produzem alteração de aminoácidos, são sinónimas (R471R e R575R, respetivamente), pelo que não se verificam alterações na estrutura terciária proteica nem na função.

Até à data têm sido descritos múltiplos polimorfismos sinónimos e não sinónimos da proteína *kelch* K13 em África e na Ásia, estando todos reunidos na Tabela XIV (Amambua-Ngwa *et al.*, 2012; Ariey *et al.*, 2014; Takala-Harrison *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014b; Kamau *et al.*, 2014; Conrad *et al.*, 2014; Naser Mohon A *et al.*, 2014). De todos os polimorfismos descritos, são poucos os partilhados entre os dois continentes, o que sugere uma elevada variabilidade da proteína *kelch* K13 a nível global.

Tabela XIV. Polimorfismos do gene PF3D7_1343700 descritos na literatura e no presente estudo

Polimorfismo	Tipo mutação	Localização geográfica	Referência
F439F	Sinónima	Uganda	a
G449D	Não sinónima	Mali	b
G449A	Não sinónima	Cambodja	c
N458Y	Não sinónima	Cambodja	c
S459S	Sinónima	Gana	d
I465T	Não sinónima	Uganda	a
Q467Q	Sinónima	Uganda	a
E469E	Sinónima	Gana	d
C469C	Sinónima	Gana, Quênia, Malawi	c,d
W470X	Não sinónima	Mali	b
R471R	Sinónima	Angola, RD Congo, Gabão	b,d, próprio
T474I	Não sinónima	Cambodja	c
M476I*	Não sinónima	<i>In vitro</i>	c
T478T	Sinónima	Costa de Marfim, Quênia	d
A481V	Não sinónima	Cambodja	c
A489A	Sinónima	Gambia	d
Y493H*	Não sinónima	Cambodja	c
Y493Y	Sinónima	RD Congo, Gana, Tanzânia	d
V494I	Não sinónima	Moçambique	próprio
G496G	Sinónima	Mali, RD Congo, Costa de Marfim	b,d
K503K	Sinónima	Mali	d
T508N	Não sinónima	Cambodja	c
G509G	Sinónima	Quênia	d
R513R	Sinónima	RD Congo	b
V520A	Não sinónima	Gambia, Mali, RD Congo, Quênia, Burkina Faso, Malawi, Tanzânia	b
S522C	Não sinónima	Uganda	b
S522S	Sinónima	Uganda	b
P527T	Não sinónima	Cambodja	c
G533S	Não sinónima	Cambodja	c
T535T	Sinónima	Gana	d
N537I	Não sinónima	Cambodja	c
R539T*	Não sinónima	Cambodja	c
C542Y	Não sinónima	Burkina Faso	b
I543T*	Não sinónima	Cambodja, Vietnam	a,e
G544R	Não sinónima	Gana	b
G545E	Não sinónima	Mali	b

P553L	Não sinónima	Quénia, Malawi, Cambodja, Vietnam	b,c,e
P553P	Sinónima	Mali	b
A557S	Não sinónima	RD Congo, Costa de Marfim	b,d
Y558H	Sinónima	Uganda	a
R561C	Não sinónima	Mali	b
R561H	Não sinónima	Cambodja	c
V566I	Não sinónima	Gana	d
E567E	Sinónima	Costa de Marfim	d
V568G	Não sinónima	Cambodja	c
A569T	Não sinónima	Quénia	d
P574L	Não sinónima	Cambodja, Myanmar, Vietnam	c,e
S576L	Não sinónima	Tanzânia	d
R575R	Sinónima	Angola	próprio
A578S	Não sinónima	RD Congo, Gabão, Gana, Quénia, Mali, Uganda, Bangladesh	a,c,d,f
C580Y*	Não sinónima	Cambodja, Myanmar, Vietnam	c,e
V581V	Sinónima	RD Congo	b
D584V	Não sinónima	Cambodja	c
V589V**	Sinónima	RD Congo	b
L589I**	Não sinónima	Gabão	d
G597G	Sinónima	Costa de Marfim	d
L610L	Sinónima	Gana	d
E612D	Não sinónima	Gambia	g
A617T	Não sinónima	RD Congo, Uganda	a,b
A617V	Não sinónima	Mali	b
L619S	Não sinónima	Uganda	a
S623C	Não sinónima	Cambodja	c
Y630F	Não sinónima	Quénia	d
V637A	Não sinónima	RD Congo	b
V637D	Não sinónima	Uganda	a
G638R	Não sinónima	Mali, Burkina Faso	b
Q654Q	Sinónima	Malawi	b

Legenda: a negrito os polimorfismos descritos neste estudo; *polimorfismos associados com resistência às artemisininas; **polimorfismos no mesmo locus segundo as respetivas referências. Referências: a) Conrad *et al.*, 2014; b) Taylor *et al.* 2014b; c) Ariei *et al.* 2014; d) Kamau *et al.*, 2014; e) Takala-Harrison *et al.*, 2014; f) Naser-Mohon *et al.*, 2014; i) Amambua-Ngwa *et al.* 2012.

As sequencias contendo os SNPs encontram-se depositadas no GeneBank sob os números de acesso: KP262063, KP262064, KP262065, KP262066 e KP262067.

A mutação R471R, presente em duas amostras do ano 2010 (após introdução dos ACTs em Angola) das províncias de Malanje e Luanda (Angola), tem sido reportada em outros dois países de África Ocidental, na República Democrática do Congo (Kinshasa, 2007; Taylor *et al.*, 2014b) e no Gabão (Libreville; Kamau *et al.*, 2014). Este SNP não foi detetado em nenhuma das 100 amostras (Angola e Moçambique) coletadas antes da introdução dos ACTs. Apesar da proximidade geográfica entre Malanje (Angola) e Kinshasa (RD Congo) torna-se difícil concluir se a presença deste polimorfismo comum se possa dever a uma dispersão de um mesmo clone de parasitas ou ao aparecimento da mesma mutação de forma aleatória nos dois locais de forma independente.

Recentemente, Takala-Harrison *et al.* (2014) demonstraram, através da utilização da análise de haplotipos, que a dispersão das mutações no gene K13 detetadas em várias regiões do Sudeste Asiático deve-se a dois mecanismos: o surgimento independente da mesma mutação em estirpes com diferente *background* genético, e ao surgimento e dispersão de mutações a partir de uma população comum. A importância deste achado é que a origem múltipla destes polimorfismos limita a eficácia das medidas de contenção em zonas geográficas, pelo que os esforços para eliminar parasitas resistentes terá um impacto limitado em áreas vizinhas. Desta forma, as medidas que visam reduzir a pressão de seleção de resistências, como descontinuar a comercialização em monoterapia de derivados da artemisinina, eliminar fármacos contrafeitos ou com doses subterapêuticas e monitorizar as resistências ao fármaco parceiro nas ACTs são essenciais.

Alguns autores apontam, nesta nova era de resistência às artemisinias, para uma renovada importância do fármaco associado ao derivado das artemisininas nas combinações ACT (Taylor *et al.*, 2014a; Conrad *et al.*, 2014b). As guidelines de tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* preconizam a utilização de ACTs durante um período de três dias (WHO, 2010b), o que contribui para uma melhor adesão terapêutica que os regimes de sete dias. No entanto, nestes regimes curtos o derivado da artemisinina é incapaz de remover a totalidade da massa parasitária, ficando a eficácia dependente da droga parceira de semi-vida mais longa (cinco dias para a lumefantrina até cinco semanas para a piperaquina). Durante esta fase de monoterapia, a eficácia do ACT depende apenas da droga associada.

Pelas razões acima descritas, as falências terapêuticas associadas aos ACTs têm sido atribuídas à droga parceira, como no caso da sulfadoxina-pirimetamina (Priotto *et al.*, 2003; Obonyo *et al.*, 2003; Bukirwa *et al.*, 2006) e de mefloquina (Alker *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2009). Para estes dois fármacos, os marcadores moleculares (mutações em *pfdhfr* e *pfhps* no caso de SP, e amplificação do gene *pmdr1* no caso de mefloquina) encontram-se validados e relacionam-se com falência terapêutica (Picot *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010). No caso de Moçambique e Angola, ambos os países adoptaram os ACTs em 2004 e 2006, respetivamente, inicialmente com a combinação AS-SP e AS-AQ. Desde 2009 e 2010, repetivamente, a combinação AL é a primeira linha terapêutica nos dois países e em mais 16 países africanos. A utilização de AL tem sido acompanhada, no obstante, por um incremento da seleção de polimorfismos que diminuem a sensibilidade à lumefantrina, nomeadamente no gene *pfmdr1* e *pfcr1* (Malmberg *et al.*, 2013; Venkatesan *et al.*, 2014; Conrad *et al.*, 2014b; Lobo *et al.*, 2014; Plucinski *et al.*, 2014), e por uma diminuição da sensibilidade *in vitro* ao fármaco (Lekana-Douki *et al.*, 2011; Sisowath *et al.*, 2009). Por estes motivos, parece razoável para além da monitorização de polimorfismos no gene K13, a monitorização de outros marcadores moleculares de resistência associados à droga parceira do ACT.

Os resultados deste estudo parecem mostrar um aumento na incidência de polimorfismos em relação com a introdução dos ACTs nos dois países, passando de uma taxa de 0% no período pré-ACT (2003) para 2.5% após 4-5 anos de utilização de derivados da artemisinina. Estes resultados são semelhantes aos apontados noutros estudos, em que houve um incremento na seleção de polimorfismos associados à resistência após a introdução de novas classes terapêuticas (Mbogo *et al.*, 2014).

Apesar de se encontrar estabelecida no Sudeste Asiático (WHO, 2014b), a resistência parcial às artemisininas não parece ter entrado ainda no continente Africano (Das *et al.*, 2013; Ashley *et al.*, 2014; Kamau *et al.*, 2014). Os esquemas terapêuticos continuam a ser eficazes em Moçambique (Nhama *et al.*, 2014) e Angola (Plucinski *et al.*, 2014), apesar de um caso de malária importada de Angola no Vietnã resistente ao tratamento realizado com ACT e artesunato intravenoso (Van Hong *et al.*, 2014). A resistência clínica parcial define-se pela presença de mutações em K13 e/ou pela presença de outros parâmetros

derivados de avaliações *in vivo* e *in vitro* do tratamento com derivados das artemisininas (WHO, 2014b). As artemisininas aceleram a eliminação parasitária através do efeito sobre as formas de trofozoito em anel circulantes, antes da sua adesão, e a sua posterior eliminação pelo baço (White, 1994). Por este motivo, a taxa de eliminação parasitária pode ser considerado um bom marcador de atividade do fármaco *in vivo* (White, 1997). A resistência às artemisininas caracteriza-se pelo prolongamento no tempo de eliminação parasitária (Noedl *et al.*, 2008; Dondorp *et al.*, 2009; Amaratunga *et al.*, 2012; Phyo *et al.*, 2012; Kyaw *et al.*, 2013; Hien *et al.*, 2013), que pode ainda ser apresentado como o aumento da meia-vida de eliminação parasitária igual ou superior a 5h (Flegg *et al.*, 2011). Os tempos de meia-vida de eliminação prolongados correlacionam-se *in vitro* com maiores taxas de sobrevivência das formas em anel (Saralamba *et al.*, 2011; Witowski *et al.*, 2013a; Witowski *et al.*, 2013b). No obstante, estes testes precisam de uma logística mais avançada e são aplicados de forma prospetiva, o que pode dificultar a sua generalização (Das *et al.*, 2013). Por outro lado, outro marcador de resposta parasitária precoce, a persistência de parasitemia no dia três de tratamento com ACT, foi apontado como indicador de suscetibilidade às artemisininas e como tendo uma boa correlação com a falência parasitológica tardia (Stepniewska *et al.*, 2010). O fato da parasitemia no dia três já estar incluído na prática habitual dos programas de vigilância epidemiológica da malária facilita a sua implementação, assim como o fato de poder ser revisto de forma retrospectiva. No entanto, múltiplos fatores parecem afetar o seu valor, como a massa parasitária inicial ou a idade/imunidade (Das *et al.*, 2013), pelo que a combinação com os outros métodos acima descritos parece recomendável.

Uma das implicações de uma velocidade de eliminação parasitária mais lenta é uma maior incidência de gametocitemia, o que aumenta a potencial transmissibilidade do parasita (Barnes *et al.*, 2008; Ashley *et al.*, 2014). Com o intuito de diminuir a transmissibilidade e limitar a dispersão de clones potencialmente resistentes, a OMS atualizou as suas recomendações no tratamento da malária em 2012 para incluir uma dose única de primaquina no primeiro dia de tratamento com ACT, o que sem tem revelado de difícil implementação.

A sequenciação do gene K13 para pesquisa de polimorfismos permite uma avaliação epidemiológica mais rápida, retrospectiva ou prospectiva, e menos dependente de fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos.

Nas 200 amostras analisadas, não foram encontrados os polimorfismos atualmente considerados como estando associados à resistência às artemisininas pela OMS, nomeadamente: Y493H, R539T, I543T ou C580Y (WHO, 2014b). Em estudos prévios de vigilância epidemiológica baseados na pesquisa de polimorfismos deste marcador molecular em África, as mutações associadas à resistência também não foram descritas (Amambua-Ngwa *et al.*, 2012; Conrad *et al.*, 2014; Kamau *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014b; Plucinski *et al.*, 2014), o que sugere que o tratamento com ACTs pode ser ainda eficaz nesta região a médio prazo, apesar de ser necessário manter uma estreita vigilância para prever a emergência deste fenómeno no continente Africano, que como foi discutido acima, pode surgir de forma independente ou seguir o padrão de dispersão historicamente associado aos antimaláricos sucessivamente introduzidos anteriormente: seleção no Sudeste Asiático, dispersão para África Oriental e seguidamente para o resto do continente.

Torna-se ainda importante referir que será necessário validar os polimorfismos no gene K13 em África, tendo em consideração as diferenças existentes com o Sudeste Asiático a nível clínico, epidemiológico e de diversidade genética humana e do parasita.

Outros marcadores moleculares associados a uma sensibilidade diminuída à ação dos derivados das artemisininas foram propostos (O'Brien *et al.*, 2011), nomeadamente mutações nos genes *pfcr* (Valderramos *et al.*, 2010), *pftctp* (Bhisutthibahn *et al.*, 1998; Eichhorn *et al.*, 2013), *pfATPase6* (Jambou *et al.*, 2005; Krishna *et al.*, 2010; Pillai *et al.*, 2012), *pfmrp1* (Raj *et al.*, 2009), *Falcipain-2* (Klonis *et al.*, 2011), transportador ABC (Veiga *et al.*, 2011), *pfubcth* (Hunt *et al.*, 2007) e amplificação do gene *pfmdr1* (Lim *et al.*, 2009; Chavchich *et al.*, 2010; Phompradit *et al.*, 2014). De todos os marcadores anteriores, apenas o gene PF3D7_1115700 que codifica para a protease *Falcipain-2*, aparece no estudo original de Ariey *et al.* (2014), no qual foram seleccionados vários genes mutados após pressão farmacológica com artemisinina, no entanto não se associou a um incremento na taxa de RSA_{0-3h}. A importância destes e de outros marcadores é ainda discutida, mas

nenhum deles revelou até à data uma associação tão forte com o fenotipo de resistência observado no Sudeste Asiático como as mutações no gene *kelch* K13.

Avaliação da estrutura e função dos polimorfismos da proteína kelch K13

Baseado na homologia previamente descrita com outras proteínas com domínios *kelch* (Ariey et al., 2014) foi possível realizar uma reconstrução do domínio propulsor *kelch* da proteína K13 utilizando como modelo a proteína humana KEAP1 (identificação no *Protein Data Bank*: 3VNG; Figura 10). A porção carboxi-terminal do gene PF3D7_1343700 codifica seis unidades com motivos *kelch* cuja conformação terciária é em forma de propulsor β . Esta estrutura encontra-se em múltiplas proteínas humanas que se agrupam na família de proteínas KHLH e que apresentam funções celulares diversas (Adams et al., 2000; Dhanoa et al., 2013). Dentre as 42 proteínas KHLH humanas descritas, K13 apresenta uma maior homologia para KHLH19, também conhecida como KEAP1 (Ariey et al., 2014).

A proteína KEAP1 humana funciona como um regulador negativo da resposta protetora celular mediada por Nrf2 (*Nuclear erythroid-related factor 2*), através de promover a sequestração deste no citoplasma (Ithoh et al., 1999). KEAP1 participa na degradação de Nrf2 através da promoção da sua ubiquitinação (Villeneuve et al., 2010). Em resposta ao stresse oxidativo Nrf2 sofre translocação para o núcleo onde se liga aos elementos ARE (antioxidante response elemento) ativando a transcrição de genes citoprotetores, envolvidos na resposta ao stresse oxidativo e detoxificação (Mitsuishi et al., 2012). O complexo Nrf2-KEAP1 parece atuar como defensor perante o stresse oxidativo celular (Figura 12). A mutação em qualquer uma das duas proteínas, levando a uma ativação permanente de Nrf2, supõe uma vantagem para a proliferação celular em ambientes de elevado stresse oxidativo, tendo sido envolvido em processos cancerogénicos em humanos (Taguchi et al., 2011; Mitsuishi et al., 2012).

Assumindo a homologia com a proteína humana KEAP1, pode-se inferir que a função de K13 em *P. falciparum* seja similar, e que mutações no gene promovam alterações na resposta citoprotetora em resposta ao stresse oxidativo. No entanto, não foi localizado no genoma de *P. falciparum* uma proteína de função semelhante a Nrf2 (Ariey et al., 2014).

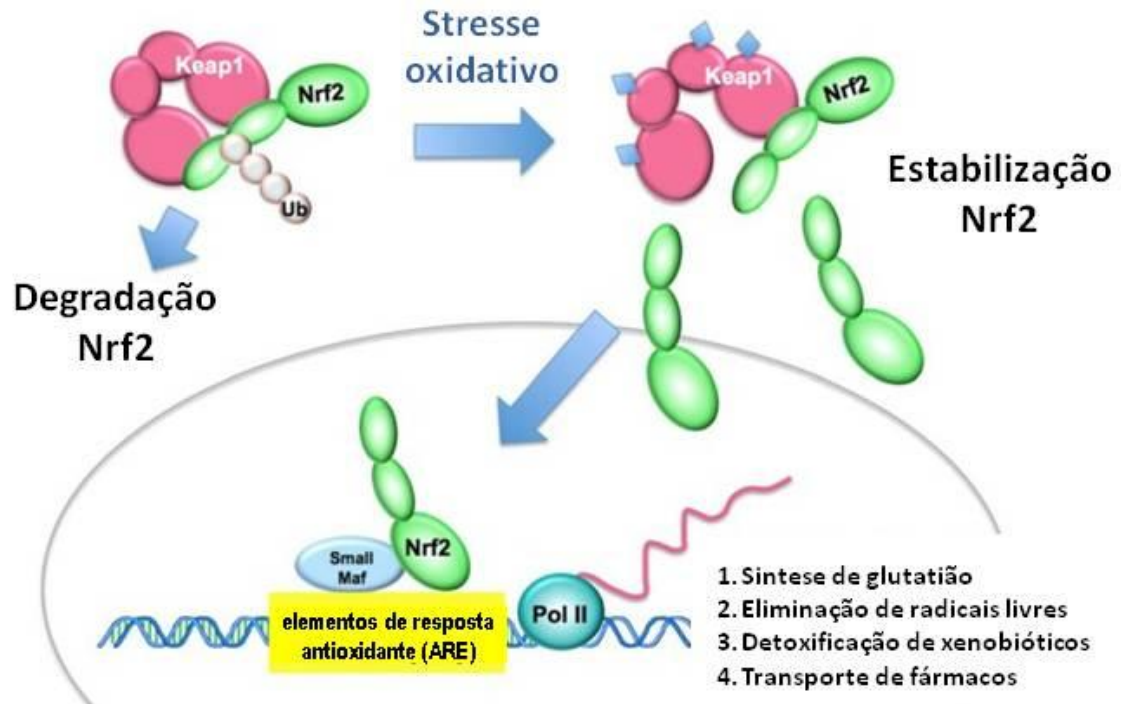


Figura 12. Representação esquemática da função do complexo KEAP1-Nrf2 (Adaptado de Mitsuishi et al., 2012). KEAP1 é uma proteína citoplasmática que regula a atividade de Nrf2. Em situações sem stresse oxidativo, Nrf2 é constantemente degradado através da via da ubiquitina (Ub), numa via dependente de KEAP1. Em situação de stresse oxidativo, KEAP1 é inativado, o que permite uma estabilização de Nrf2 que transloca para o núcleo onde se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE) ativando genes que participam na resposta citoprotetora.

O mecanismo de ação das artemisininas não se encontra ainda completamente esclarecido, apesar de existir evidência de causarem aumento de stresse oxidativo podendo lesar a membrana parasitária e de inativar proteínas do parasita (Cui *et al.*, 2009). As artemisininas são consideradas profármacos, uma vez que parece ser necessário o contato com o Ferro bivalente do grupo Heme eritrocitário para a sua bioativação. Na malária, o próprio metabolismo da hemoglobina pelo parasita conduz a uma presença aumentada de ferro bivalente disponível, explicando assim o mecanismo selectivo da ativação das artemisininas dentro do parasita em fases em que a degradação de hemoglobina é mais ativa (Klonis *et al.*, 2011).

A resistência aos antimaláricos explica-se principalmente por dois mecanismos: exclusão do fármaco do local de ação ou alteração da diana de ação, limitando assim a eficácia (Leroy *et al.*, 2014). Os polimorfismos nos genes *pfmdr1* e *pfcr1*, que codificam um

transportador localizado no vacuolo digestivo do parasita, assim como a variação no número de cópias de *pfmdr1*, têm sido associados com a resistência a antimaláricos que atuam dentro do vacuolo, como a cloroquina e outros fármacos da família das 4-aminoquinolinas. Para estes genes foi estabelecida uma fraca ligação com a suscetibilidade às artemisininas que seria explicada pelo mesmo mecanismo (Lim et al., 2009; Chavchich et al., 2010; Valderramos et al., 2011; Phompradit *et al.*, 2014). Por outro lado, exemplos típicos de mutações que alteram o alvo são as associadas a via dos folatos, genes *pfdhps* e *pfdfhr*, associados com resistência a sulfadoxina e pirimetamina, respetivamente, mas sem interesse na resistência aos derivados das artemisininas. No caso das mutações no gene da proteína propulsor *kelch* K13, o mecanismo de ação poderia estar associado a uma vantagem de sobrevivência dos parasitas com mutações que confirmam uma melhor adaptação a um ambiente de stresse oxidativo como o gerado pela ação das artemisininas. Esta vantagem estaria refletida num aumento do tempo de eliminação da parasitemia, marcador que atualmente define a resistência parcial a estes fármacos (WHO, 2014b).

Neste estudo foi utilizado um modelo de previsão de alteração na função biológica de polimorfismos na sequência proteica (Choi *et al.*, 2012), em variantes de proteínas não humanas, utilizando a proteína KEAP1 como homólogo humano. Este modelo apresenta, segundo os autores, uma sensibilidade de 80.4% e especificidade de 78.6%. A precisão do modelo é de 78.17% quando analisadas substituições simples de aminoácidos. No caso dos polimorfismos de K13 descritos por Arieu et al. (2014) associados à resistência parcial às artemisininas (WHO, 2014b), o modelo previu que a função proteica se encontraria afetada em praticamente todos os casos, excepto no caso de R539T. No entanto este polimorfismo está também associado à perda de suscetibilidade e falência terapêutica (Arieu *et al.*, 2014). Para o polimorfismo V494I descrito neste estudo, o modelo não prevê alteração de função da proteína, porém, perante a ausência de resultados *in vivo* e *in vitro*, deverão ser efetuados novos estudos para concluir pela ausência desta ligação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Ghani R, Al-Maktari MT, Al-Shibani LA, Allam AF. A better resolution for integrating methods for monitoring *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs. *Acta Tropica*. 2014;137:44-57.
- Adams J, Kelso R, Cooley L. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol*. 2000 Jan;10(1):17-24.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª Edição. 2010. Editora Artmed.
- Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, Tsuyuoka R, Maguire JD, Fandeur T, Arieu F, Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Pfm-dr1 and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in falciparum malaria on the Cambodian-Thai border. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Apr;76(4):641-7.
- Amambua-Ngwa A, Tetteh KK, Manske M, Gomez-Escobar N, Stewart LB, Deerhake ME, Cheeseman IH, Newbold CI, Holder AA, Knuepfer E, Janha O, Jallow M, Campino S, Macinnis B, Kwiatkowski DP, Conway DJ. Population genomic scan for candidate signatures of balancing selection to guide antigen characterization in malaria parasites. *PLoS Genet*. 2012;8(11):e1002992. doi: 10.1371/journal.pgen.1002992.
- Amaratunga C, Neal AT, Fairhurst RM. Flow cytometry-based analysis of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the ring-stage survival assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Aug;58(8):4938-40. doi: 10.1128/AAC.02902-14.
- Arieu F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Ménard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC, Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Ménard D. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;505(7481):50-5.
- Barnes KI, Little F, Mabuza A, Mngomezulu N, Govere J, Durrheim D, Roper C, Watkins B, White NJ. Increased gametocytemia after treatment: an early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in falciparum malaria. *J Infect Dis*. 2008 Jun 1;197(11):1605-13. doi: 10.1086/587645.
- Bhisutthibhan J, Pan XQ, Hossler PA, Walker DJ, Yowell CA, Carlton J, Dame JB, Meshnick SR. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J Biol Chem*. 1998 Jun 26;273(26):16192-8.
- Bukirwa H, Critchley J. Sulfadoxine-pyrimethamine plus artesunate versus sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jan 25;(1):CD004966.

- Centers for Disease Control and Prevention. CDC Health Information for International Travel 2014. New York: Oxford University Press; 2014.
- Chavchich M, Gerena L, Peters J, Chen N, Cheng Q, Kyle DE. Role of pfmdr1 amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jun;54(6):2455-64. doi: 10.1128/AAC.00947-09.
- Cheeseman IH, Miller BA, Nair S, Nkhoma S, Tan A, Tan JC, Al Saai S, Phyo AP, Moo CL, Lwin KM, McGready R, Ashley E, Imwong M, Stepniewska K, Yi P, Dondorp AM, Mayxay M, Newton PN, White NJ, Nosten F, Ferdig MT, Anderson TJ. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science*. 2012;336(6077):79-82.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 2012;7(10): e46688.
- Conrad MD, Bigira V, Kapisi J, Muhindo M, Kamya MR, Havlir DV, Dorsey G, Rosenthal PJ. Polymorphisms in K13 and falcipain-2 associated with artemisinin resistance are not prevalent in *Plasmodium falciparum* isolated from Ugandan children. *PLoS One*. 2014 Aug 21;9(8):e105690. doi: 10.1371/journal.pone.0105690.
- Conrad MD, LeClair N, Arinaitwe E, Wanzira H, Kakuru A, Bigira V, Muhindo M, Kamya MR, Tappero JW, Greenhouse B, Dorsey G, Rosenthal PJ. Comparative impacts over 5 years of artemisinin-based combination therapies on *Plasmodium falciparum* polymorphisms that modulate drug sensitivity in Ugandan children. *J Infect Dis*. 2014 Aug 1;210(3):344-53. doi: 10.1093/infdis/jiu141.
- Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*. 1988 Nov 25;16(22):10881-90.
- Cowman A, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*. 2012;198(6):961-71. doi: 10.1083/jcb.201206112.
- Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y, Narann TS, Seila S, Lim C, Incardona S, Lim P, Sem R, Socheat D, Christophel EM, Ringwald P. Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. *Trop Med Int Health*. 2006 Sep;11(9):1360-6.
- Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P, Lindegardh N, Yi P, Top SN, Socheat D, Fandeur T, Annerberg A, Christophel EM, Ringwald P. Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Trop Med Int Health*. 2006 Dec;11(12):1800-7.
- Dhanoo BS, Cogliati T, Satish AG, Bruford EA, Friedman JS. Update on the Kelch-like (KLHL) gene family. *Hum Genom*. 2013 May 15;7(1):13. doi: 10.1186/1479-7364-7-13.

- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):455-67. doi: 10.1056/NEJMoa0808859.
- Eichhorn T, Winter D, Büchele B, Dirdjaja N, Frank M, Lehmann WD, Mertens R, Krauth-Siegel RL, Simmet T, Granzin J, Efferth T. Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol*. 2013 Jan 1;85(1):38-45. doi: 10.1016/j.bcp.2012.10.006.
- Figueiredo P, Benchimol C, Lopes D, Bernardino L, Rosario V, Varandas L, Nogueira F. Prevalence of *pfdmr1*, *pfcrt*, *pfdhfr* and *pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola. *Malar J*. 2008;7:236.
- Fortes F, Dimbu R, Figueiredo P, Neto Z, do Rosário VE, Lopes D. Evaluation of prevalence's of *pfdhfr* and *pfdhps* mutations in Angola. *Malar J*. 2011 Feb 2;10:22. doi: 10.1186/1475-2875-10-22.
- Gething PW. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malaria J*. 2011;10:378.
- Hunt P, Afonso A, Creasey A, Culleton R, Sidhu AB, Logan J, Valderramos SG, McNae I, Cheesman S, do Rosario V, Carter R, Fidock DA, Cravo P. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Mol Microbiol*. 2007 Jul;65(1):27-40.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*. 1999 Jan 1;13(1):76-86.
- Jianzhu Ma, Sheng Wang, Feng Zhao, and Jinbo Xu. Protein threading using context-specific alignment potential. *Bioinformatics (Proceedings of ISMB 2013)*, Vol. 29, Issue 13, pp. i257-i265.
- Jian Peng and Jinbo Xu. A multiple-template approach to protein threading. *Proteins*. 2011 Jun;79(6):1930-9. doi: 10.1002/prot.23016.
- Jian Peng and Jinbo Xu. RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins*. 2011;79(S10):161-71.
- Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, Mumba D, Kekre M, William Y, Mead D, Marielle BA, Apinjoh T, Golassa L, Randrianarivelojosia M, Andagalu B, Maiga-Ascofare O, Amambua-Ngwa A, Tindana P, Ghansah A, MacInnis B, Kwiatkowski D, Djimde A. K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from sub-Saharan Africa. *J Infect Dis*. 2014 Nov 2. pii: jiu608.

- Klonis N, Crespo-Ortiz MP, Bottova I, Abu-Bakar N, Kenny S, Rosenthal PJ, Tilley L. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 12;108(28):11405-10. doi: 10.1073/pnas.1104063108.
- Krishna S, Pulcini S, Fatih F, Staines H. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. *Trends Parasitol*. 2010 Nov;26(11):517-23. doi: 10.1016/j.pt.2010.06.014.
- Krishna S, Kremsner PG. Antidogmatic approaches to artemisinin resistance: reappraisal as treatment failure with artemisinin combination therapy. *Trends Parasitol*. 2013;29(7):313-7.
- Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, Yi P, Bouth DM, Bouchier C, Puijalón OM, Meshnick SR, Wongsrichanalai C, Fandeur T, Le Bras J, Ringwald P, Ariey F. Pfm^{dr1} copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. *Malar J*. 2009 Jan 12;8:11. doi: 10.1186/1475-2875-8-11.
- Lim P, Dek D, Try V, Eastman RT, Chy S, Sreng S, Suon S, Mao S, Sopha C, Sam B, Ashley EA, Miotto O, Dondorp AM, White NJ, Su XZ, Char MC, Anderson JM, Amaratunga C, Menard D, Fairhurst RM. Ex vivo susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in western, northern, and eastern Cambodia, 2011-2012: association with molecular markers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov;57(11):5277-83. doi: 10.1128/AAC.00687-13. Epub 2013 Aug 12.
- Lekana-Douki JB, Dinzouna Boutamba SD, Zatra R, Zang Edou SE, Ekomy H, Bisvigou U, Toure-Ndouo FS. Increased prevalence of the *Plasmodium falciparum* Pfm^{dr1} 86N genotype among field isolates from Franceville, Gabon after replacement of chloroquine by artemether-lumefantrine and artesunate-mefloquine. *Infect Genet Evol*. 2011 Mar;11(2):512-7. doi: 10.1016/j.meegid.2011.01.003.
- Leroy D, Campo B, Ding X, Burrows JN, Cherbuin S. Defining the biology component of the drug discovery strategy for malaria eradication. *Trends Parasitol*. 2014;1-13.
- Lobo E, Sousa B, Rosa S, Figueiredo P, Lobo L, Pateira S, Fernandes N, Nogueira F. Prevalence of pfm^{dr1} alleles associated with artemether-lumefantrine tolerance/resistance in Maputo before and after the implementation of artemisin-based combination therapy. *Malaria J*. 2014;13:300.
- Malmberg M, Ngasala B, Ferreira PE, Larsson E, Jovel I, Hjalmarsson A, Petzold M, Premji Z, Gil JP, Björkman A, Mårtensson A. Temporal trends of molecular markers associated with artemether-lumefantrine tolerance/resistance in Bagamoyo district, Tanzania. *Malar J*. 2013 Mar 18;12:103. doi: 10.1186/1475-2875-12-103.
- Mbogo GW, Nankoberanyi S, Tukwasibwe S, Baliraine FN, Nsobya SL, Conrad MD, Arinaitwe E, Kamya M, Tappero J, Staedke SG, Dorsey G, Greenhouse B, Rosenthal PJ. Temporal changes in prevalence of molecular markers mediating antimalarial drug resistance in a high malaria transmission setting in Uganda. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Jul;91(1):54-61. doi: 10.4269/ajtmh.13-0647.

- Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancer: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol.* 2012 Dec 26;2:200. doi: 10.3389/fonc.2012.00200.
- Morten Källberg, Haipeng Wang, Sheng Wang, Jian Peng, Zhiyong Wang, Hui Lu, and Jinbo Xu. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols.* 2012;7:151122.
- Nhama A, Bassat Q, Enosse S, Nhacolo A, Mutemba R, Carvalho E, Naueia E, Sevene E, Guinovart C, Warsame M, Sanz S, Mussa A, Matsinhe G, Alonso P, Tiago A, Macete E. In vivo efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in children: a multisite, open-label, two-cohort, clinical trial in Mozambique. *Malar J.* 2014 Aug 10;13:309. doi: 10.1186/1475-2875-13-309.
- Obonyo CO, Ochieng F, Taylor WR, Ochola SA, Mugitu K, Olliaro P, ter Kuile F, Oloo AJ. Artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated malaria in Kenyan children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003 Sep-Oct;97(5):585-91.
- O'Brien C, Henrich PP, Passi N, Fidock DA. Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin Infect Dis.* 2011 Dec;24(6):570-7. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834cd3ed.
- Phompradit P, Wisedpanichkij R, Muhamad P, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Molecular analysis of pfp6 and pfmdr1 polymorphisms and their association with in vitro sensitivity in *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Myanmar border. *Acta Trop.* 2011 Oct-Nov;120(1-2):130-5. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.07.003.
- Phompradit P, Muhamad P, Wisedpanichkij R, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Four years' monitoring of in vitro sensitivity and candidate molecular markers of resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-mefloquine combination in the Thai-Myanmar border. *Malar J.* 2014 Jan 15;13:23. doi: 10.1186/1475-2875-13-23.
- Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, ler Moo C, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NP, White NJ, Anderson TJ, Nosten F. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet.* 2012 May 26;379(9830):1960-6. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60484-X.
- Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malar J.* 2009; 4:89.
- Pillai DR, Lau R, Khairnar K, Lepore R, Via A, Staines HM, Krishna S. Artemether resistance in vitro is linked to mutations in PfATP6 that also interact with mutations in PfMDR1 in travellers returning with *Plasmodium falciparum* infections. *Malar J.* 2012 Apr 27;11:131. doi: 10.1186/1475-2875-11-131.

- Pimentel S, Nogueira F, Benchimol C, Quinhentos V, Bom J, Varandas L, Rosário V, Bernardino L. Detection of atovaquone-proguanil resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b gene in Luanda, Angola. *Malaria J.* 2006;5:30
- Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(6):565-8
- Plucinski MM, Talundzic E, Morton L, Dimbu PR, Macaia AP, Fortes F, Goldman I, Lucchi N, Stennies G, MacArthur JR, Udhayakumar V. Efficacy of Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine for the Treatment of Uncomplicated Malaria in Children in Zaire and Uíge Provinces, Angola. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Nov 3. pii: AAC.04181-14.
- Priotto G, Kabakyenga J, Pinoges L, Ruiz A, Eriksson T, Coussement F, Ngambe T, Taylor WR, Perea W, Guthmann JP, Oliaro P, Legros D. Artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine combinations for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Uganda: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003 May-Jun;97(3):325-30.
- Raj DK, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, Sullivan M, Fay MP, McCutchan TF, Su XZ. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *J Biol Chem.* 2009 Mar 20;284(12):7687-96. doi: 10.1074/jbc.M806944200.
- Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science.* 2004;305(5687):1124
- Saralamba S, Pan-Ngum W, Maude RJ, Lee SJ, Tarning J, Lindegårdh N, Chotivanich K, Nosten F, Day NP, Socheat D, White NJ, Dondorp AM, White LJ. Intrahost modeling of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 4;108(1):397-402. doi: 10.1073/pnas.1006113108.
- Sheng Wang, Jianzhu Ma, Jian Peng, & Jinbo Xu. Protein structure alignment beyond spatial proximity. *Scientific Reports.* 2013;3.
- Sheng Wang, Jian Peng, & Jinbo Xu. Alignment of distantly related protein structures: algorithm, bound and implications to homology modeling. *Bioinformatics.* 2011; 27.
- Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:687-92
- Sisowath C, Petersen I, Veiga MI, Mårtensson A, Premji Z, Björkman A, Fidock DA, Gil JP. In vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible pfcr1 K76 allele after

- treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *J Infect Dis.* 2009 Mar 1;199(5):750-7. doi: 10.1086/596738.
- Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 2011 Feb;16(2):123-40. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x.
- Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, Cummings MP, Silva JC, Dondorp AM, Fukuda MM, Hien TT, Mayxay M, Noedl H, Nosten F, Kyaw MP, Nhien NT, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Arie F, Mercereau-Puijalon O, Menard D, Newton PN, Khanthavong M, Hongvanthong B, Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Khan WA, Phyo AP, Nyunt MM, Nyunt MH, Brown TS, Adams M, Pepin CS, Bailey J, Tan JC, Ferdig MT, Clark TG, Miotto O, MacInnis B, Kwiatkowski DP, White NJ, Ringwald P, Plowe CV. Independent Emergence of Artemisinin Resistance Mutations Among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. *J Infect Dis.* 2014 Sep 1. pii: jiu491.
- Taylor SM, Juliano JJ. Artemisinin combination therapies and malaria parasite drug resistance: The game is afoot. *J Infect Dis.* 2014 Aug 1;210(3):335-7. doi: 10.1093/infdis/jiu142.
- Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, Tagbor H, Williams J, Bojang K, Njie F, Desai M, Kariuki S, Gutman J, Mathanga DP, Mårtensson A, Ngasala B, Conrad MD, Rosenthal PJ, Tshefu AK, Moormann AM, Vulule JM, Doumbo OK, Ter Kuile FO, Meshnick SR, Bailey JA, Juliano JJ. Absence of Putative Artemisinin Resistance Mutations Among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: A Molecular Epidemiologic Study. *J Infect Dis.* 2014 Sep 1. pii: jiu467.
- Valderramos SG, Valderramos JC, Musset L, Purcell LA, Mercereau-Puijalon O, Legrand E, Fidock DA. Identification of a mutant PfCRT-mediated chloroquine tolerance phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* 2010 May 13;6(5):e1000887. doi: 10.1371/journal.ppat.1000887.
- Van Hong N, Amambua-Ngwa A, Tuan NQ, Cuong do D, Giang NT, Van Dung N, Tinh TT, Van Tien N, Phuc BQ, Duong TT, Rosanas-Urgell A, D'Alessandro U, Van Geertruyden JP, Erhart A. Severe malaria not responsive to artemisinin derivatives in man returning from Angola to Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jul;20(7):1199-202. doi: 10.3201/eid2007.140155.
- Varandas L, Vandunem J, Benchimol C, Quinhentos V, Ferrinho P, Gonçalves L, Bernardino L: Tratamento efectivo na malária com moderada/alta parasitémia, em crianças, com uma toma diária de quinino em Luanda, Angola. *Acta Med Angolana.* 2007, 16:15-20.
- Veiga MI, Ferreira PE, Jörnhaugen L, Malmberg M, Kone A, Schmidt BA, Petzold M, Björkman A, Nosten F, Gil JP. Novel polymorphisms in *Plasmodium falciparum* ABC transporter genes are associated with

- major ACT antimalarial drug resistance. PLoS One. 2011;6(5):e20212. doi: 10.1371/journal.pone.0020212.
- Venkatesan M, Gadalla NB, Stepniewska K, Dahal P, Nsanzabana C, Moriera C, Price RN, Mårtensson A, Rosenthal PJ, Dorsey G, Sutherland CJ, Guérin P, Davis TM, Ménard D, Adam I, Ademowo G, Arze C, Baliraine FN, Berens-Riha N, Björkman A, Borrmann S, Checchi F, Desai M, Dhorda M, Djimdé AA, El-Sayed BB, Eshetu T, Eyase F, Falade C, Faucher JF, Fröberg G, Grivoyannis A, Hamour S, Houzé S, Johnson J, Kamugisha E, Kariuki S, Kiechel JR, Kironde F, Kofoed PE, LeBras J, Malmberg M, Mwai L, Ngasala B, Nosten F, Nsohya SL, Nzila A, Oguike M, Otienoburu SD, Ogutu B, Ouédraogo JB, Piola P, Rombo L, Schramm B, Somé AF, Thwing J, Ursing J, Wong RP, Zeynudin A, Zongo I, Plowe CV, Sibley CH; ASAQ Molecular Marker Study Group; WWARN AL. Polymorphisms in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: parasite risk factors that affect treatment outcomes for P. falciparum malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine. Am J Trop Med Hyg. 2014 Oct;91(4):833-43. doi: 10.4269/ajtmh.14-0031. Epub 2014 Jul 21.
- Vijaykadga S1, Rojanawatsirivej C, Cholpol S, Phoungmanee D, Nakavej A, Wongsrichanalai C. In vivo sensitivity monitoring of mefloquine monotherapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Thailand in 2003. Trop Med Int Health. 2006 Feb;11(2):211-9.
- Vijaykadga S, Alker AP, Satimai W, MacArthur JR, Meshnick SR, Wongsrichanalai C. Delayed Plasmodium falciparum clearance following artesunate-mefloquine combination therapy in Thailand, 1997-2007. Malar J 2012;11:296. doi: 10.1186/1475-2875-11-296.
- Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD. Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. Antioxid Redox Signal. 2010 Dec 1;13(11):1699-712. doi: 10.1089/ars.2010.3211.
- Vinayak S, Alam MT, Sem R, Shah NK, Susanti AI, Lim P, Muth S, Maguire JD, Rogers WO, Fandeur T, Barnwell JW, Escalante AA, Wongsrichanalai C, Arie F, Meshnick SR, Udhayakumar V. Multiple genetic backgrounds of the amplified Plasmodium falciparum multidrug resistance (pfmdr1) gene and selective sweep of 184F mutation in Cambodia. J Infect Dis 2010;201(10):1551-60.
- Webster HK, Thaithong S, Pavanand K, Yongvanitchit K, Pinswasdi C, Boudreau EF. Cloning and characterization of mefloquine-resistant Plasmodium falciparum from Thailand. Am J Trop Med Hyg 1985;34(6):1022-7.
- White NJ. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemisinin and derivatives. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88(suppl1):S41-S43.

- White NJ. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1413–1422.
- White N. Malaria: a molecular marker of artemisin resistance. *The Lancet* 2014;383:1439-40.
- Wichman O, Muehlberger N, Jelinek T, Alifrangis M, Peyerl-Hoffmann G, Mühlen M, Grobusch M, Gascon J, Matteelli A, Laferl H, Bisoffi Z, Ehrhardt S, Cuadros J, Hatz C, Gjørup I, McWhinney P, Beran J, Cunha S, Schulze M, Kollaritsch H, Kern P, Fry G, Richter J. Screening for mutations related to atovaquone-proguanil resistance in treatment failures and other imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *J Infect Dis* 2004;190:1541-1546
- Witkowski B, Iriart X, Soh PN, Menard S, Alvarez M, Naneix-Laroche V, Marchou B, Magnaval JF, Benoit-Vical F, Berry A. *pfmdr1* amplification associated with clinical resistance to mefloquine in West Africa: implications for efficacy of artemisinin combination therapies. *J Clin Microbiol.* 2010 Oct;48(10):3797-9. doi: 10.1128/JCM.01057-10.
- Witkowski B, Khim N, Chim P, Kim S, Ke S, Kloeung N, Chy S, Duong S, Leang R, Ringwald P, Dondorp AM, Tripura R, Benoit-Vical F, Berry A, Gorgette O, Arie F, Barale JC, Mercereau-Puijalon O, Menard D. Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Feb;57(2):914-23. doi: 10.1128/AAC.01868-12.
- Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, Lim P, Mao S, Sopha C, Sam B, Anderson JM, Duong S, Chuor CM, Taylor WR, Suon S, Mercereau-Puijalon O, Fairhurst RM, Menard D. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis.* 2013 Dec;13(12):1043-9. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70252-4.
- Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 2008;14(5):716-9. doi: 10.3201/eid1405.071601.
- Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(4):209-18.
- World Health Organization. Antimalarial drug combination therapy. Report of a WHO Technical Consultation. WHO/CDS/RBM/2001.35. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
- World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.
- World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 2nd edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010a.
- World Health Organization. Global report on antimalarial drug efficacy and resistance: 2000-2010. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010b.

- World Health Organization. Global plan for artemisinin resistance containment (GPARC). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
- World Health Organization. World Malaria Report 2013. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013a.
- World Health Organization. Emergency response to artemisinin resistance in the Greater Mekong subregion. Regional framework for action 2013-2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013b.
- World Health Organization. Status report on artemisin resistance. January 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014a.
- World Health Organization. Status report on artemisin resistance. September 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014b.

ANEXOS

Anexo 1. Posição dos primers na sequência do gene PF3D7_1343700. Primers K13_PCR em caixa branca, primers K13_Nested em caixa cinzenta.

```

ATGGAAGGAGAAAAAGTAAAAACAAAAGCAAATAGTATCTCGAATTTTTCTATGACGTAT
GATAGGGAATCTGGTGGTAACAGCAATAGTGATGATAAAAGCGGAAGTAGTAGCGAGAAT
GATTCTAATTCATTTATGAATCTAACTAGTGATAAAAATGAGAAAACGGAATAATAGT
TTCCTTTTAAATAATAGTAGTTATGGAAATGTTAAAGATAGCCTATTAGAATCCATTGAT
ATGAGTGTATTAGATTTCGAACCTTGATAGTAAAAAGATTTTTTACCAAGTAATTTATCA
AGAACATTTAATAATATGTCTAAAGATAATATAGGAAATAAATATTTAAATAAATTGTTA
AATAAAAAAAGATACTATTACAAATGAAAATAATAATATTAATCATAATAATAAATAAT
AATAATCTGACAGCAAATAATACTAATAATCTTATTAATAATAATATGAATCTCCA
TCAATTATGAATACCAACAAAAAGAGAATTTTTTAGATGCAGCAAATCTTATAAATGAT
GATTCTGGATTAAACAATTTAAAAAATTTTCAACTGTAAATAATGTAAATGATACTTAT
GAAAAGAAAATTATTGAAACGGAATTAAGTGATGCTAGTGATTGTGAAAATATGGTAGGT
GATTTAAGAATTACATTTATTAATTGGTTAAAAAAGACACAAATGAATTTATTTCGAGAA
AAAGATAAATTATTTAAAGATAAGAAAGAACTAGAAATGGAAAGAGTACGATTGTACAAA
GAATTAGAAAACCGTAAAAATATTGAAGAACAGAAATTACATGATGAAAGAAAGAAATTA
GATATTGATATATCTAATGGTTATAAACAAATAAAAAAGAAAAAGAAACATAGGAAA
CGATTTGATGAAGAAAGATTAAGATTTTTTACAAGAAATCGATAAAATTAATTAGTATTA
TATTTAGAAAAAGAAAAATATTATCAAGAATATAAAAAATTTTGAGAATGATAAAAAAAA
ATTGTTGATGCAAATATTGCTACTGAACTATGATTGATATTAATGTTGGTGGAGCTATT
TTTGAAACATCTAGACATACCTTAACACAACAAAAAGATTCATTTATAGAGAAATTATTA
AGTGGAAGACATCATGTAACCAGAGATAAAACAAGGAAGAATATTCTTAGATAGGGATAGT
GAGTTATTTAGAATTATACTTAACTTCTTAAGAAATCCGTTAACTATACCCATACCAAAA
GATTTAAGTGAAAGTGAAGCCTTGTTGAAAGAAGCAGAATTTTATGGTATTAAATTTTAA
CCATTCCTATTAGTATTTTGTATAGGTGGATTTGATGGTGTAGAATATTTAAATTCGATG
GAATTATTAGATATTAGTCAACAATGCTGGCGTATGTGTACACCTATGTCTACCAAAAAA
GCTTATTTTGGAAGTGCTGTATTGAATAATTTCTTATACGTTTTTGGTGGTAATAACTAT
GATTATAAGGCTTTATTTGAACTGAGGTGTATGATCGTTTAAAGAGATGTATGGTATGTT
TCAAGTAATTTAAATATACCTAGAAGAAATAATTGTGGTGTACGTCAAATGGTAGAATT
TATTGTATTGGGGGATATGATGGCTCTTCTATTATACCGAATGTAGAAGCATATGATCAT
CGTATGAAAGCATGGGTAGAGGTGGCACCTTTGAATACCCCTAGATCATCAGCTATGTGT
GTTGCTTTTGATAATAAAATTTATGTATTGGTGGAATAATGGTGAGAGATTAAATTCCT
ATTGAAGTATATGAAGAAAAAATGAATAAATGGGAACAATTTCCATATGCCTTATTA
GCTAGAAGTTCAGGAGCAGCTTTTAATTACCTTAATCAAATATATGTTGTTGGAGGTATT
GATAATGAACATAACATATTAGATTCGTTGAACAATATCAACCATTTAATAAAAAGATGG
CAATTTCTAAATGGTGTACCAGAGAAAAAATGAATTTTGGAGCTGCCACATTGTCAGAT
TCTTATATAATTACAGGAGGAGAAAAATGGCGAAGTTCTAAATTATGTATTCTTTTCA
CCAGATACAAATGAATGGCAGCTTGGCCCATCTTTATTAGTTCCAGATTTGGTCACTCC
GTTTTAATAGCAAATATATAA

```

Anexo 2. Descrição por ano, localização, procedimento e estado de K13 das amostras

Amostra	Ano	País	Localidade	1º PCR	2º PCR	Estado K13
9-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
22-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
32-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
42-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
47-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
48-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
55-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
63-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
65-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
67-A03	2003	Angola	Maianga	✓	✓	wild type
73-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
78-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
80-A03	2003	Angola	Maianga	✓	✓	wild type
82-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
84-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
92-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
104-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
105-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
106-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
109-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
111-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
113-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
117-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
120-A03	2003	Angola	Maianga	✓	✓	wild type
123-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
124-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
125-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
130-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
133-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
136-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
137-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
138-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
140-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
142-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
143-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
145-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
148-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
149-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
150-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
157-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
166-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
170-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
171-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
172-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
178-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
180-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
184-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
203-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
226-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type
236-A03	2003	Angola	Maianga	✓		wild type

Amostra	Ano	País	Localidade	1º PCR	2º PCR	Estado K13
226-A10	2010	Angola	Maianga	✓		wild type
292-A10	2010	Angola	Maianga	✓		wild type
293-A10	2010	Angola	Maianga	✓	✓	wild type
211-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
212-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
213-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
214-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
215-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
216-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
218-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
219-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
220-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
221-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
222-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
223-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
224-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
225-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
230-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
231-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
232-A10	2010	Angola	Rangel	✓		R471R
234-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
235-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
236-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
237-A10	2010	Angola	Rangel	✓		wild type
240-A10	2010	Angola	Kwanza N	✓		wild type
241-A10	2010	Angola	Kwanza N	✓		wild type
242-A10	2010	Angola	Kwanza N	✓		wild type
243-A10	2010	Angola	Kwanza N	✓		wild type
244-A10	2010	Angola	Kwanza N	✓		wild type
245-A10	2010	Angola	Kwanza N	✓		wild type
246-A10	2010	Angola	Kwanza N	✓		wild type
269-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
270-A10	2010	Angola	Malanje	✓		R471R
271-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
273-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
274-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
275-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
276-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
278-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
279-A10	2010	Angola	Malanje	✓	✓	wild type
280-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
282-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
283-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
284-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
285-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
286-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
288-A10	2010	Angola	Malanje	✓	✓	wild type
289-A10	2010	Angola	Malanje	✓		R575R
290-A10	2010	Angola	Malanje	✓		wild type
291-A10	2010	Angola	Malanje	✓	✓	wild type

Amostra	Ano	País	Localidade	1º PCR	2º PCR	Estado K13
260-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
261-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
262-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
287-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
289-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
299-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
300-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
301-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
302-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
303-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
304-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
305-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
307-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
308-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
309-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
310-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
311-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
312-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
313-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
314-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
315-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
316-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
317-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
318-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
319-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
320-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
321-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓	✓	wild type
322-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓	✓	wild type
323-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
324-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓	✓	wild type
325-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
326-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
327-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
328-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
329-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
330-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
331-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
332-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
333-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
334-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
335-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
336-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
337-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
338-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
339-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
342-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓	✓	wild type
345-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
349-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
350-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type
352-M03	2003-05	Moçambique	Maputo	✓		wild type

Amostra	Ano	País	Localidade	1º PCR	2º PCR	Estado K13
4-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
52-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
63-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
66-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
81-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
92-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
103-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
114-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
116-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
121-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
127-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
131-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
136-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
141-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
146-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		V494I
147-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
163-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
168-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
172-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
178-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
179-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
181-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
188-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
189-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
191-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
202-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
203-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
208-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
209-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
215-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
217-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
226-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		V494I
232-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
238-M10	2010-12	Moçambique	Boane	✓		wild type
4-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
18-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
72-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
80-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
82-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
90-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
93-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
96-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
107-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
108-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
110-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
113-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
115-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
121-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
122-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type
123-M12	2010-12	Moçambique	Maputo	✓		wild type

Anexo 3. Alinhamento de sequências referentes aos polimorfismos encontrados

A) G1480A → V494I (amostra 146-M10)

```

1401                                                                    1470
3D7   ACAATGCTGG CGTATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT
146K13KF                                     AAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT
146K13KR                                TATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT
Consensus ..... ..tatgtgta cacctatgtc taccaaAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT

1471                                                                    1540
3D7   TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT
146K13KF TTCTTATACA TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT
146K13KR TTCTTATACA TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT
Consensus TTCTTATACa TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT

1541                                                                    1610
3D7   TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA
146K13KF TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA
146K13KR TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA
Consensus TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA

1611                                                                    1680
3D7   TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT
146K13KF TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT
146K13KR TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT
Consensus TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT

1681                                                                    1750
3D7   CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG
146K13KF CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG
146K13KR CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG
Consensus CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG

1751                                                                    1820
3D7   ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA
146K13KF ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA
146K13KR ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA
Consensus ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA

1821                                                                    1890
3D7   AATGAATAAA TGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAA GTT CAGGAGCAGC TTTTAATTAC
146K13KF AATGAATAAA TGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAA NTT CAGGAGCA
146K13KR AATGAATAAN NGNNCNTNNN NNNN
Consensus AATGAATAAa tGggaacaat ttccatatgc cttattagaa gctagaa.t t caggagca.. .....
```

B) G1480A → V494I (amostra 226-M10)

	1401		1470
3D7	ACAATGCTGG	CGTATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT	
226K13F		AA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT	
226K13R		TATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT	
Consensustatgtgta cacctatgtc taccaaaaAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT	
	1471		1540
3D7	TTCTTATACG	TTTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT	
226K13F	TTCTTATACA	TTTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT	
226K13R	TTCTTATACA	TTTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT	
Consensus	TTCTTATACA	TTTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT	
	1541		1610
3D7	TAAGAGATGT	ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA	
226K13F	TAAGAGATGT	ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA	
226K13R	TAAGAGATGT	ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA	
Consensus	TAAGAGATGT	ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA	
	1611		1680
3D7	TGGTAGAATT	TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT	
226K13F	TGGTAGAATT	TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT	
226K13R	TGGTAGAATT	TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT	
Consensus	TGGTAGAATT	TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT	
	1681		1750
3D7	CGTATGAAAG	CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG	
226K13F	CGTATGAAAG	CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG	
226K13R	CGTATGAAAG	CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG	
Consensus	CGTATGAAAG	CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG	
	1751		1820
3D7	ATAATAAAAT	TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA	
226K13F	ATAATAAAAT	TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA	
226K13R	ATAATAAAAT	TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA	
Consensus	ATAATAAAAT	TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA	
	1821		1890
3D7	AATGAATAAA	TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAAGTT CAGGAGCAGC TTTTAATTAC	
226K13F	AATGAATAAA	TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAATNN CAGGAGCA	
226K13R	AANGAATAAA	TGG-AACNNN NNNNNNNN	
Consensus	AATGAATAAA	TGGgAACaAt ttccatagtc cttattagaa gctagaa... caggagca..	

C) T1413C → R471R (amostra 232-A10)

```

1331                                                                    1400
3D7 TAGTATTTTG TATAGGTGGA TTGATGGTG TAGAATATTT AAATTCGATG GAATTATTAG ATATTAGTCA
232+PF                                     NNNNNNNN NNNNNNNNNN
Consensus .....nnannan anannannna

1401                                                                    1470
3D7 ACAATGCTGG CGTATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT
232+PF NNNATGCTGG CGCATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT
Consensus anaATGCTGG CGCATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT

1471                                                                    1540
3D7 TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT
232+PF TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT
Consensus TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT

1541                                                                    1610
3D7 TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA
232+PF TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA
Consensus TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA

1611                                                                    1680
3D7 TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT
232+PF TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT
Consensus TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT

1681                                                                    1750
3D7 CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG
232+PF CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG
Consensus CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG

1751                                                                    1820
3D7 ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA
232+PF ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA
Consensus ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA

1821                                                                    1890
3D7 AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCAGC TTTTAATTAC
232+PF AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCA
Consensus AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCAa. ....

```

D) T1413C → R471R (amostra 270-A10)

	1331		1400
3D7	TAGTATTTTG TATAGGTGGA TTGATGGTG TAGAATATTT AAATTCGATG GAATTATTAG ATATTAGTCA		
270+PF		NNNNNNNN NNNNNNNAN	
Consensusannannan anannannaa	

	1401		1470
3D7	ACAATGCTGG CGTATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT		
270+PF	NNNATGCTGG CGCATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT		
Consensus	anaATGCTGG CGCATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT		

	1471		1540
3D7	TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT		
270+PF	TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT		
Consensus	TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT		

	1541		1610
3D7	TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA		
270+PF	TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA		
Consensus	TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA		

	1611		1680
3D7	TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT		
270+PF	TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT		
Consensus	TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT		

	1681		1750
3D7	CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG		
270+PF	CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG		
Consensus	CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG		

	1751		1820
3D7	ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA		
270+PF	ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA		
Consensus	ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA		

	1821		1890
3D7	AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCAGC TTTTAATTAC		
270+PF	AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCA		
Consensus	AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCA..		

E) G1725A → R575R (amostra 289-A10)

	1331		1400
3D7	TAGTATTTTG TATAGGTGGA TTTGATGGTG TAGAATATTT AAATTCGATG GAATTATTAG ATATTAGTCA		
289+PF	NNNNNNANN TNNNNNNANN		
Consensus naannnaan anannanan		
	1401		1470
3D7	ACAA TGCTGG CGTATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT		
289+PF	NNNN TGCTGG CGTATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT		
Consensus	anaa TGCTGG CGTATGTGTA CACCTATGTC TACCAAAAAA GCTTATTTTG GAAGTGCTGT ATTGAATAAT		
	1471		1540
3D7	TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT		
289+PF	TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT		
Consensus	TTCTTATACG TTTTGGTGG TAATAACTAT GATTATAAGG CTTTATTTGA AACTGAGGTG TATGATCGTT		
	1541		1610
3D7	TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA		
289+PF	TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA		
Consensus	TAAGAGATGT ATGGTATGTT TCAAGTAATT TAAATATACC TAGAAGAAAT AATTGTGGTG TTACGTCAAA		
	1611		1680
3D7	TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT		
289+PF	TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT		
Consensus	TGGTAGAATT TATTGTATTG GGGGATATGA TGGCTCTTCT ATTATACCGA ATGTAGAAGC ATATGATCAT		
	1681		1750
3D7	CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG		
289+PF	CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG		
Consensus	CGTATGAAAG CATGGGTAGA GGTGGCACCT TTGAATACCC CTAGATCATC AGCTATGTGT GTTGCTTTTG		
	1751		1820
3D7	ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA		
289+PF	ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA		
Consensus	ATAATAAAAT TTATGTCATT GGTGGAAC TAAGTGAGAG ATTAAATTCT ATTGAAGTAT ATGAAGAAAA		
	1821		1890
3D7	AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCAGC TTTTAATTAC		
289+PF	AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCA		
Consensus	AATGAATAAA TGGGAACAAT TTCCATATGC CTTATTAGAA GCTAGAAGTT CAGGAGCA..		